

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 891**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 7/12 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012** **PCT/US2012/040744**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012** **WO12167251**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012** **E 12793107 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 2714070**

54 Título: **Agonistas del receptor de GLP-1/glucagón de acción prolongada**

30 Prioridad:

02.06.2011 US 201161492448 P
16.04.2012 US 201261624589 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.10.2024

73 Titular/es:

OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)
16 Ashlegan Street
Kiryat Gat 8211804, IL

72 Inventor/es:

FIMA, UDI, EYAL y
HERSHKOVITZ, OREN

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 2 981 891 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

Agonistas del receptor de GLP-1/glucagón de acción prolongada

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Se describen la oxintomodulina pegilada y pegilada inversa incluyendo composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas y usos médicos de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 Proteínas y péptidos especialmente cortos son susceptibles a la desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. Por consiguiente, las proteínas tienen típicamente cortas semividas circulatorias de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se administran generalmente en una frecuencia sostenida con el fin de mantener una concentración en plasma efectiva del péptido activo. Por otra parte, puesto que los fármacos peptídicos se administran habitualmente por infusión, la inyección frecuente de fármacos peptídicos provocan un malestar considerable a un sujeto. Por lo tanto, hay una necesidad de tecnologías que prolonguen las semividas de las proteínas y los péptidos terapéuticos al tiempo que se mantenga una alta eficacia farmacológica de los mismos. Fármacos peptídicos deseados de este tipo también
- 15 deben cumplir los requisitos de una estabilidad en suero potenciada, alta actividad y una baja probabilidad para inducir una respuesta inmune no deseada cuando se inyectan en un sujeto.

- 20 La farmacocinética desfavorable, tal como una semivida en suero corta, puede prevenir el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos de fármacos prometedores de otro modo. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula, y se debe determinar experimentalmente para cada nuevo fármaco potencial. Por ejemplo, con fármacos proteínicos de bajo peso molecular, los mecanismos de depuración fisiológicos tal como la filtración renal pueden hacer inviable el mantenimiento de los niveles terapéuticos de un fármaco debido al costo o la frecuencia del régimen de dosificación requerido.

- 25 El tracto gastrointestinal es el responsable de sintetizar y liberar muchas hormonas peptídicas que regulan la conducta alimentaria, incluyendo la proteína pancreática (PP), péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), péptido YY (PYY) y Oxintomodulina (OXM). La OXM surge de un procesamiento post-transicional específico de tejido de proglucagón en el intestino y el SNC. Contiene 37 aminoácidos, incluyendo la secuencia de glucagón completa con una extensión de octapéptido básica C-terminal que ha demostrado que contribuye a las propiedades de OXM tanto in vitro como in vivo, pero no fue suficiente por sí sola para los efectos del péptido. En respuesta a la ingestión de alimentos, la OXM se secreta por las células L intestinales en el torrente sanguíneo proporcionalmente al contenido calórico de la comida.
- 30

- 35 La OXM potencia la depuración de la glucosa a través de la estimulación de la secreción de insulina después de la administración tanto oral como intraperitoneal. También regula el control de la ingesta de alimentos. La inyección intracerebroventricular (ICV) e intranuclear de OXM en los núcleos paraventricular y arqueado (ARC) del hipotálamo inhibe la re-alimentación en ratas en ayunas (Dakin et al 2001; Dakin et al 2004). Esta inhibición también se ha demostrado en ratas alimentadas libremente al comienzo de la fase de oscuridad. Por otra parte, la administración periférica de OXM de forma dependiente de la dosis inhibió la ingesta de alimentos tanto inducida por el ayuno como por la fase de oscuridad (Dakin et al. 2004).

- El documento US 2010/0144617 describe derivados de oxintomodulina que han sido mutados para proporcionar una oxintomodulina estabilizada que no presenta actividad de agonista del receptor de glucagón.

- 40 Un nuevo enfoque conceptual denominado pegilación reversible se describió anteriormente (Publicación PCT N° WO 98/05361; Gershonov et al, 2000), para prolongar la semivida de las proteínas y los péptidos. De acuerdo con esta tecnología, profármacos se preparan derivatizando el fármaco con grupos funcionales que son sensibles a las bases y eliminables bajo condiciones básicas suaves, tales como condiciones fisiológicas. La derivatización incluye una sustitución de al menos un grupo amino, hidroxilo mercapto y/o carboxilo de la molécula de fármaco con un enlazador tal como 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) y 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS), al cual se une un grupo del resto de polietilenglicol (PEG). El enlace entre el resto de PEG y el fármaco no es directo, sino más bien ambos residuos se enlazan a diferentes posiciones de las estructuras de FMS o Fmoc de armazón que son altamente sensibles a las condiciones básicas. El documento US 2006/0171920 describe métodos para la pegilación reversible de insulina, un interferón, un agonista de PYY, una exendina, un péptido natriurético atrial, hormona del crecimiento humana, eritropoyetina, TNF- α , calcitonina, hormona liberadora de gonadotropina, hirudina, glucagón y un fragmento de anticuerpo monoclonal.
- 50

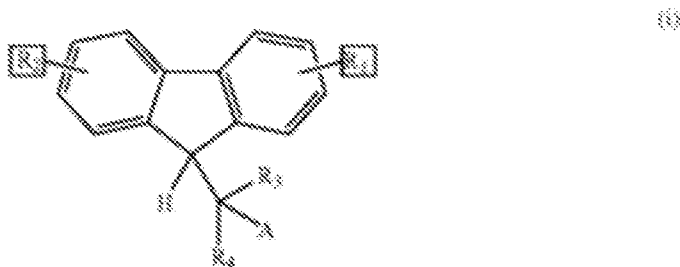
- 55 Hershkovitz *et al.* describen MOD-6030, un agonista dual de GLP-1/Glucagón de larga acción que mejora el control glicémico e induce un efecto anti-obesidad prolongado en ratones obesos inducidos por la dieta con una inyección potencial una vez a la semana en seres humanos (19 de abril de 2012, XP002734249, <https://www.gtcbio.com/preview/diabetes2012/abstracts.htm>). Prolor Biotech describe un Oxintomodulina-MOD-6030 PEGilado reversible de larga acción (XP002734251,

http://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1268659/000114420412022748/v309878_ex99-1.htm).

La presente invención se refiere a derivados de OXM en los cuales la semivida del péptido se prolonga utilizando la tecnología de pegilación reversible.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula $(X)_n-Y$, en donde Y es un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón que consiste en un péptido de oxintomodulina (OXM) que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 y que porta un grupo amino o hidroxilo libre, y en donde X es un radical de fórmula (i)



- 10 en donde

R₁ es un resto polietilenglicol (PEG);

R₂ es hidrógeno o es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno;

R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno;

A es -OCO-, en donde el radical de fórmula (i) está enlazado a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y; y

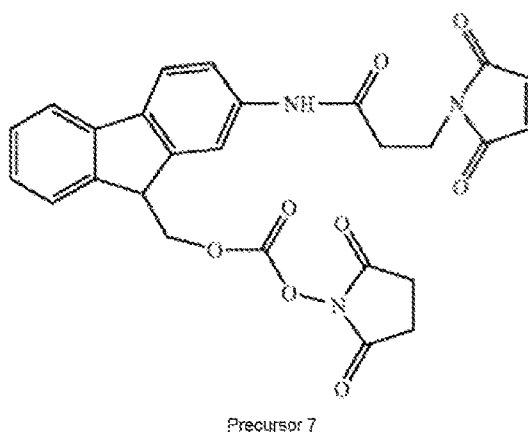
- 15 n es un número entero de al menos uno.

En una realización, el resto PEG es un PEG lineal.

En una realización, el resto PEG es un PEG ramificado.

En una realización, el resto PEG es un PEG de 30 kDa, 40 kDa o 60 kDa.

En una realización, el compuesto se prepara a partir de un MAL-Fmoc-NHS que tiene la fórmula:



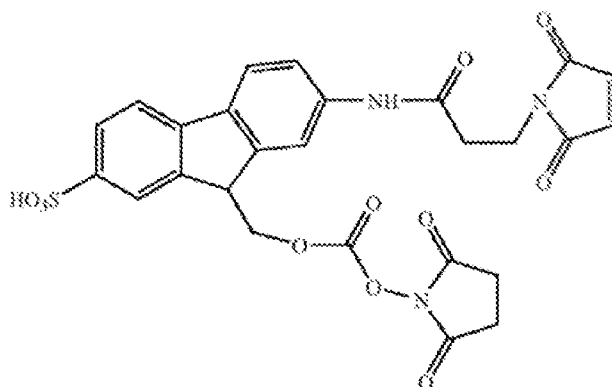
Precursor 7

- 20

en donde el compuesto se designa como (PEG-Fmoc)-n-OXM.

En una realización, Y está enlazada al radical Fmoc a través de un grupo amino, que en una realización es el extremo amino de la oxintomodulina.

En una realización, el compuesto se prepara a partir de MAL-FMS-NHS que tiene la fórmula



Precursor 8

en donde dicho compuesto se designa como (PEG-FMS-)*n*-OXM.

En una realización, Y está enlazado al radical FMS a través de un grupo amino que, en una realización, es el extremo amino de la oxintomodulina.

- 5 En una realización, el PEG está enlazado al radical FMS o Fmoc a través de un grupo sulfhidrilo.

La presente invención proporciona también una composición que comprende un compuesto de la presente invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

- 10 La presente invención proporciona, además, un método para la preparación de oxintomodulina que tiene una semivida biológica extendida, que consiste en la etapa de conjugar oxintomodulina, un polímero de polietilenglicol (polímero PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:1:0,5 a 1:1:3,5 para formar un compuesto de la invención.

La presente invención proporciona un compuesto o una composición de la invención para uso en inducir la tolerancia a la glucosa y/o en mejorar el control glicémico, o para uso en reducir la ingesta de alimentos y/o reducir el peso corporal en un sujeto que lo necesite.

- 15 La presente invención proporciona también un compuesto de la invención para uso en tratar diabetes mellitus, diabetes mellitus asociada con la obesidad, obesidad, un trastorno de la alimentación o un trastorno metabólico en un sujeto.

La presente invención proporciona también un compuesto o una composición de la invención para uso como un medicamento.

- 20 En una realización, R₂ es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno, y el resto PEG es un PEG de 40 kDa.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención se dan a modo de ilustración solamente, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30 La **Figura 1** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético de OXM, PEG₁₀-Fmoc-OXM y PEG₂₀-Fmoc-OXM en ratas macho. Las ratas recibieron una inyección única de bolo SC de OXM nativa (62 nmol/kg), PEG₁₀-Fmoc-OXM (que contiene 278 µg/kg de péptido OXM) o PEG₂₀-Fmoc-OXM (que contiene 62 nmol/kg de péptido OXM) en 0,5 ml de tampón PBS. Las muestras de suero se recogieron de la vena yugular en los momentos especificados y la concentración de OXM se analizó utilizando el kit de Elisa de OXM (Bachem, Suiza).

- 35 La **Figura 2** son gráficas que muestran el perfil farmacocinético de OXM y PEG₄₀-Fmoc-OXM en ratas macho. Las ratas recibieron una inyección única de bolo IV (A) o SC (B) de OXM nativa (62 nmol/kg) o PEG₄₀-Fmoc-OXM (que contiene 62 nmol/kg de péptido OXM por peso corporal) en 0,5 ml de tampón PBS. Las muestras de suero se recogieron de la vena yugular en los momentos especificados y la concentración de OXM se analizó utilizando el kit de Elisa de OXM (Bachem, Suiza). La inserción de superposición resalta el perfil de OXM el cual es evidente en las primeras dos horas después de la administración.

La **Figura 3** es una gráfica que muestra la actividad in vitro de OXM nativa, PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-

EMCS-OXM. Células CHO-K1 que sobre-expresan el receptor de GLP-1 (Millipore HTS163C2) se sembraron en 96 pocillos de media área blancas a una densidad de 200.000 células/ml y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de OXM (ALMAC), PEG40-EMCS-OXM y PEG40-Fmoc-OXM con o sin suero de rata al 1 % (Bio reclamation). Las concentraciones de cAMP en las células se cuantificaron por ensayo HTRF (Cisbio 62AM4PEB) y el parámetro de CE50 se analizó por el software PRISM.

La **Figura 4** son gráficas que muestran la inducción de la tolerancia a la glucosa en ratones con OXM nativa y PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-EMCS-OXM como se mide por la prueba de tolerancia a la glucosa IP (IPGTT). Ratones C57BL/6 se mantuvieron en ayunas durante la noche y luego se les inyectaron IP PBS (vehículo), PEG₄₀-Osu como control (546 nmol/kg), OXM nativa (333 nmol/kg), PEG₄₀-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido) y PEG₄₀-EMCS-OXM (333 nmol/kg). La glucosa (1,5 g/kg) se administró IP ya sea 15 min después de la administración del artículo de ensayo (vehículo, OXM y PEG₄₀-Osu) o 120 min después de la administración de PEG₄₀-Fmoc-OXM. Los niveles de glucosa en sangre se midieron por muestreo en la vena de la cola antes de la administración de glucosa y 10, 20, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa utilizando un glucómetro portátil. La gráfica (A) proporciona el perfil de glucosa en sangre y la gráfica (B) muestra el AUC de la glucosa.

La **Figura 5** son gráficas que muestran el efecto de la administración SC de OXM (b.i.d, siglas inglesas de dos veces al día) y PEG40-FMS-OXM (días 1, 3, 5, 7) en el peso corporal (A) y la ingesta de alimentos acumulada (B) en ratones C57BL/6J macho que presentan obesidad inducida por la dieta. Los datos son medias ajustadas (n = 10). Los SEMs (siglas inglesas de error estándar de la media) se calcularon de los residuos del modelo estadístico. A los ratones se les dosificó durante 7 días, pariendo del Día 1. Los datos se analizaron por ANCOVA con el peso corporal el Día 1 como co-variable seguido por el test de Williams (OXM en PBS) o test t múltiple (sibutramina y PEG40-FMS-OXM) frente a vehículo apropiado. Las diferencias significativas frente a vehículo apropiado: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Los valores porcentuales indican la diferencia del grupo de vehículo apropiado el Día 8 (es decir, después de 7 días de dosificación).

La **Figura 6** es una gráfica que muestra el efecto de la administración SC de OXM (b.i.d) y OXM PEG40-EMCS-OXM pegilada covalentemente unida (1000 nmol/kg y 5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7 u 8000 nmol/kg los Días 1 y 7), PEG40-FMS-OXM (1000 nmol/kg y 5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7 u 8000 nmol/kg los Días 1 y 7) y PEG30-FMS-OXM (5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7) en el peso corporal (A) y la ingesta de alimentos (B) en ratones C57BL/6J machos que presentan obesidad inducida por la dieta. Los datos son medias ajustadas (n = 10). Los SEMs se calculan de los residuos del modelo estadístico. Los ratones fueron dosificados durante 7 días comenzando el Día 1.

La **Figura 7** muestra los efectos de la administración de OXM PEGilada reversible en el peso corporal en Ratones con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO, por sus siglas en inglés). Durante la primera semana del alojamiento único (período de manipulación), los animales comenzaron un protocolo de manipulación una vez al día y durante la segunda semana (período de referencia), se les dosificó el vehículo apropiado b.i.d. o una vez a la semana, ya que se les dosificó durante el período de tratamiento por una vía subcutánea. 7 grupos (n = 8) de ratones DIO fueron dosificados durante 29 días como sigue: A. PEG40-SH (662 mg/kg), B. PEG40-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), C. PEG30-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), D. PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), E. PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), F. Vehículo (PBS), y G. OXM (6.000 nmol/kg; PBS). Durante el período inicial y el período de tratamiento se registraron diariamente la ingesta de alimentos, la ingesta de agua y el peso corporal. La administración semanal de PEG40-FMS-OXM o PEG30-FMS-OXM redujo significativamente el peso corporal en ratones con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO).

La **Figura 8** muestra los efectos agudos de la administración de OXM PEGilada reversible en la tolerancia a la glucosa en ratones con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO). El día 1 después del inicio de la administración de fármaco o vehículo, todos los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche. El día 2, los ratones se sometieron a una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT, por sus siglas en inglés). Cada uno de los animales fue dosificado con vehículo o compuesto de ensayo y 60 minutos más tarde se dosificaron con D-glucosa (2 g/kg p.o.). Muestras de sangre iniciales se tomaron inmediatamente antes de la dosificación con vehículo o compuesto de ensayo (B1) e inmediatamente antes de la carga de glucosa (B2). Las muestras de sangre adicionales se tomaron 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa. Todas las muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y sometieron a ensayo en cuanto a la glucosa (n = 2) e insulina (n = 1) utilizando el reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y ELISA de insulina de ratón ultrasensible Alpco (80-INSMSU-E10), respectivamente.

La **Figura 9** muestra los efectos de la administración de OXM PEGilada reversible en glucosa terminal, glicerol, colesterol e insulina en ratones con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO). Se recogieron muestras de plasma terminal (24 horas después de la dosis final del compuesto de ensayo o de control el Día 29) por punción cardíaca y se sometieron a ensayo en cuanto a insulina, glucosa y colesterol utilizando ELISA de insulina de ratón ultrasensible (80-INSMSU-E10), reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y

reactivo de colesterol Thermolectron Infinity (TR13421).

La **Figura 10** muestra los efectos de la administración de OXM PEGilada reversible en el análisis de la composición de cuerpo terminal de la grasa, agua, proteínas y cenizas (hueso) en Ratones con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO). Los niveles de la grasa corporal (A), agua (B), proteínas (C) y cenizas (D) de los cadáveres de ratones DIO se determinaron utilizando técnicas de análisis químico estándares. Los grupos de tratamiento fueron como sigue: A. PEG40-SH (662 mg/kg), B. PEG40-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), C. PEG30-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), D. PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), E. PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), F. Vehículo (PBS) y G. OXM (6.000 nmol/kg; PBS).

La **Figura 11** muestra que la administración de variantes de PEG-OXM PEG40-EMCS-OXM, PEG30-EMCS-OXM, PEG40-FMS-OXM, PEG30-FMS-OXM produjo reducciones acusadas y significativas en la glucosa en ayunas e insulina en plasma en ayunas en comparación con los controles.

La **Figura 12** muestra que la administración de variantes de PEG-OXM PEG30-FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG60-FMS-OXM produjo reducciones acusadas y significativas en la glucosa en ayunas e insulina en plasma en ayunas en comparación con los controles.

La **Figura 13** muestra que la administración de variantes de PEG-OXM PEG5-FMS-OXM, PEG30-FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG60-FMS-OXM produjo reducciones acusadas y significativas en el peso corporal en comparación con los controles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula $(X)_n-Y$, en donde Y es agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón que consiste en un péptido de oxintomodulina (OXM) que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 y que porta un grupo amino o hidroxilo libre, y en donde X es un radical de fórmula (i), en donde R_1 es un resto de polietilenglicol (PEG); R_2 es hidrógeno o es $-SO_3H$ en la posición 2 del anillo de fluoreno; R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno; A es $-OCO-$, en donde el radical de fórmula (i) está enlazado a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y; y n es un número entero de al menos uno.

En una realización, el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En otra realización, la composición consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la expresión "agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón" y el término "agonista" se utilizan indistintamente en la presente.

En una realización, el término "funcional" se refiere a la capacidad del agonista u OXM proporcionado en la presente de tener actividad biológica, que incluye pero no se limita a, reducción de peso, aumento de sensibilidad a la insulina, etc., como se proporciona adicionalmente en la presente.

En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada. En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada invertida. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada invertida. En otra realización, las expresiones "oxintomodulina de acción prolongada", "oxintomodulina pegilada invertida", "OXM PEGilada reversible" y "una composición que comprende o que consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS)" se utilizan indistintamente. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es OXM enlazada a PEG a través de Fmoc o FMS.

En otra realización, el agonista comprende un polímero de PEG conjugado con el extremo amino de un péptido de oxintomodulina a través de Fmoc o FMS. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada de la invención comprende un polímero de PEG conjugado con el extremo amino de un péptido oxintomodulina a través de Fmoc o FMS.

En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o que consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:0,2-10:0,2-10. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o que consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:0,5-2:0,5-2. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o que consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:1:1. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada incluye un

polímero de PEG conjugado con el extremo amino de oxintomodulina a través de Fmoc o FMS.

En una realización, el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada está enlazado a PEG a través de un enlazador reversible tal como Fmoc o FMS. En otra realización, la oxintomodulina de acción prolongada está enlazada a PEG a través de un enlazador reversible tal como Fmoc y FMS. En otra realización, Fmoc y FMS son sensibles a las bases y son eliminables bajo condiciones fisiológicas. En otra realización, un enlazador reversible es un enlazador que es sensible a las bases y es eliminable bajo condiciones fisiológicas. En otra realización, un enlazador reversible es un enlazador que es sensible a las bases y es eliminable bajo condiciones fisiológicas en la sangre, el plasma o la linfa. En otra realización, un enlazador reversible es un enlazador que es sensible a las bases y es eliminable bajo condiciones fisiológicas en un fluido corporal. En otra realización, un enlazador reversible es un enlazador que es eliminable en un fluido corporal que tiene un pH básico. En otra realización, un enlazador que es sensible a las bases se escinde tras la exposición a un entorno básico, liberando así la OXM del enlazador y PEG.

En otra realización, una oxintomodulina pegilada inversa es una composición en donde la OXM esta enlazada a PEG a través de un enlazador reversible. En otra realización, una oxintomodulina pegilada inversa libera la OXM libre tras la exposición a un entorno básico. En otra realización, una oxintomodulina pegilada inversa libera la OXM libre tras la exposición a la sangre o plasma. En otra realización, una oxintomodulina de acción prolongada comprende PEG y oxintomodulina que no están enlazados directamente entre sí, como en los procedimientos de pegilación estándares, sino más bien ambos residuos están enlazados a diferentes posiciones de Fmoc o FMS que son altamente sensibles a las bases y son eliminables bajo condiciones fisiológicas regulares. En otra realización, condiciones fisiológicas regulares incluyen un entorno fisiológico tal como la sangre o plasma.

En otra realización, las estructuras y los procedimientos para producir Fmoc y FMS se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 7585837.

En otra realización, la pegilación inversa hace que la OXM sea una OXM de acción prolongada. En otra realización, la oxintomodulina de acción prolongada es una oxintomodulina con una semivida biológica prolongada.

En una realización, la pegilación inversa proporciona protección contra la degradación de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón. En otra realización, la pegilación inversa proporciona protección contra la degradación de OXM. En otra realización, la pegilación inversa afecta a la C_{max} de OXM para reducir los efectos secundarios dañinos. En otra realización, la pegilación inversa extiende la T_{max} de OXM. En otra realización, la pegilación inversa extiende la semivida circulatoria de OXM. En otra realización, la OXM pegilada inversa tiene biodisponibilidad mejorada en comparación con la OXM no modificada. En otra realización, la OXM pegilada inversa tiene actividad biológica mejorada en comparación con la OXM no modificada. En algunas realizaciones, la pegilación inversa mejora la potencia de la OXM.

En otras realizaciones, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de medidas bioquímicas. En otras realizaciones, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de las medidas farmacológicas. En otras realizaciones, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de capacidad de unión (Kd). En otras realizaciones, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de absorción a través del sistema digestivo. En otras realizaciones, una OXM pegilada inversa es más estable durante la absorción a través del sistema digestivo que la OXM no modificada.

En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado inverso presenta un área de sangre bajo los niveles de curva (AUC) mejorada en comparación con el agonista libre. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta un área de sangre bajo los niveles de curva (AUC) mejorada en comparación con la OXM libre. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta actividad biológica y un área de sangre bajo los niveles de curva (AUC) mejoradas en comparación con la OXM libre. En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado inverso presenta un tiempo de retención de la sangre ($t_{1/2}$) mejorado en comparación con la OXM libre. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta un tiempo de retención de la sangre ($t_{1/2}$) mejorado en comparación con la OXM libre. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta actividad biológica y un tiempo de retención de la sangre ($t_{1/2}$) mejorados en comparación con la OXM libre. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta niveles de C_{max} en la sangre mejorados en comparación con la OXM libre, reduciendo con ello los efectos secundarios potencialmente dañinos. En otra realización, una OXM pegilada inversa presenta actividad biológica mejorada en comparación con la OXM libre. En otra realización, los compuestos son útiles para mejorar el AUC, la C_{max} , el $t_{1/2}$, la actividad biológica de OXM, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, en una realización, los compuestos son útiles para mejorar el área bajo la curva (AUC) de oxintomodulina.

La actividad agonista de GLP-1 o glucagón de cualquier péptido análogo del glucagón dado se puede cuantificar determinando un valor de CE_{50} para ese péptido en un ensayo seleccionado para la actividad de GLP-1 o glucagón. Como el experto en la técnica estará consciente, el valor de CE_{50} es una medida de la

concentración a la cual se logra la mitad de ésta actividad máxima del compuesto en el ensayo particular. En esta memoria descriptiva, al valor de CE_{50} en un ensayo para la actividad agonista de GLP-1 o glucagón se le aludirá como $CE_{50}[GLP-1]$ y $CE_{50}[Glu]$, respectivamente. En los casos en los que se comparan valores de CE_{50} de diferentes compuestos, se entenderá que estos describen la actividad de los compuestos relevantes en el mismo ensayo bajo condiciones de otro modo idénticas.

La relación de $CE_{50}[Glu]/CE_{50}[GLP-1]$ para el péptido análogo del glucagón puede ser mayor que la relación de $CE_{50}[Glu]/CE_{50}[GLP-1]$ para el glucagón. Esto se puede interpretar en el sentido de que el péptido análogo del glucagón tiene una mayor selectividad para el receptor de GLP-1 que el glucagón.

En otra realización, la mejora del AUC, la C_{max} , el $t_{1/2}$, la actividad biológica de OXM, o cualquier combinación de los mismos conjugando un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de OXM libre a través de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) permite la reducción de la frecuencia de dosificación de OXM. En otra realización, conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino o residuos de lisina de OXM a través de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) permite una reducción de la frecuencia de dosificación de OXM. En otra realización, la pegilación inversa de OXM es ventajosa al permitir que se utilicen dosificaciones bajas.

SEQ ID NO: 1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA (SEQ ID NO: 1).

En otra realización, la OXM es OXM humana. En otra realización, a la OXM también se la alude como glucagón-37 o enteroglucagón bioactivo. En otra realización, la OXM es un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón.

En una realización, el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón se puede modificar químicamente. En otra realización, la OXM se puede modificar químicamente. En particular, se pueden modificar las cadenas laterales de aminoácidos, el extremo amino y/o el extremo ácido carboxi de OXM. Por ejemplo, la OXM puede someterse a una o más de alquilación, formación de disulfuro, complejación de metal, acilación, esterificación, amidación, nitración, tratamiento con ácido, tratamiento con base, oxidación o reducción. Métodos para realizar estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. En particular, la OXM se proporciona como un éster de alquilo inferior, una amida de alquilo inferior, una amida de dialquilo inferior, una sal por adición de ácidos, una sal carboxilato o una sal por adición de álcalis de los mismos. En particular, los extremos amino o carboxílico de la OXM se pueden derivar, por ejemplo, por esterificación, amidación, acilación, oxidación o reducción. En particular, el extremo carboxílico de la OXM se puede derivar para formar un resto amida.

En una realización, el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención mantiene la actividad biológica del agonista no modificado. En otra realización, la OXM de la invención mantiene la actividad biológica de la OXM no modificada. En una realización, la OXM de acción prolongada de la invención mantiene la actividad biológica de OXM no modificada. En otra realización, la OXM de acción prolongada de la invención comprende la actividad biológica de OXM. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción de las secreciones digestivas. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción y el retraso del vaciado gástrico. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición del patrón de motilidad de la alimentación en el intestino delgado. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la secreción de ácido estimulada por pentagastrina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende un aumento de la liberación de somatostatina gástrica. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la potenciación de los efectos del péptido YY. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la liberación de grelina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la sobreexpresión de adiponectina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción de los ácidos grasos libres. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción de los triglicéridos. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción del colesterol. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la estimulación de la acumulación de aminopirina y la producción de cAMP. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la unión del receptor de GLP-1 o el receptor de glucagón. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la estimulación de la producción de H^+ activando la adenilato ciclasa. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la secreción de ácido gástrico estimulada por histamina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la ingesta de alimentos. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la estimulación de la liberación de insulina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención

comprende la inhibición de la secreción pancreática exocrina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende el aumento de la sensibilidad a la insulina. En otra realización, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la reducción de los niveles de glucosa.

- 5 En una realización, la expresión "reducción de la concentración de" se refiere a una reducción de aproximadamente 1 – 10 % con relación a una concentración original, tipo salvaje, normal o de control. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 11-20 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 21-30 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 31-40 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 41-50 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 51-60 %.
- 10 En otra realización, la reducción es de aproximadamente 61-70 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 71-80 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 81-90 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 91-95 %. En otra realización, la reducción es de aproximadamente 96-100 %.

- 15 En una realización, la expresión "aumento de la concentración de" o el término "prolongación" se refiere a un aumento de aproximadamente 1-10 % con relación a una concentración original, tipo salvaje, normal o de control. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 11-20 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 21-30 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 31-40 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 41-50 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 51-60 %.
- 20 En otra realización, el aumento es de aproximadamente 61-70 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 71-80 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 81-90 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 91-95 %. En otra realización, el aumento es de aproximadamente 96-100 %.

- 25 La presente invención proporciona, además, el compuesto o una composición farmacéutica del mismo para uso para inducir la tolerancia a la glucosa, mejorar el control glucémico, o ambos en un sujeto en necesidad del mismo.

La presente invención proporciona, además, un método para prolongar la semivida biológica de oxintomodulina, que consiste en la etapa de conjugar oxintomodulina, un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de aproximadamente 1:1:0,5 a aproximadamente 1:1:3,5 para formar un compuesto de la invención.

- 30 La presente invención proporciona un compuesto o una composición farmacéutica de la invención para uso como un medicamento.

- La presente invención proporciona, además, el compuesto o la composición farmacéutica de la invención para uso para reducir la ingesta de alimentos, reducir el peso corporal, o ambos en un sujeto. En otra realización, el sujeto está afectado por la diabetes. En otra realización, el sujeto tiene sobrepeso. En otra realización, el sujeto está afectado por la obesidad.
- 35

- En una realización, los compuestos de PEG-OXM proporcionados en la presente inducen una reducción significativa del nivel de glucosa sin aumentar el nivel de insulina. En otra realización, los compuestos de PEG-OXM proporcionados en la presente reducen inesperadamente los niveles de glucosa junto con la reducción de los niveles de insulina en ayunas después de la administración de una dosis única de los compuestos de PEG-OXM (véase el Ejemplo 7, en la presente). Por lo tanto, en otra realización, el compuesto de la presente invención aumenta la sensibilidad a la insulina en un sujeto. En otra realización, el agonista se conjuga con dicho polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) a través de un enlazador. En otra realización, el enlazador es un enlazador flexible. En otra realización, el enlazador es un enlazador no escindible.
- 40

- En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la secreción pancreática a través de un mecanismo indirecto de los nervios vagos. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la reducción del transporte hidromineral a través del intestino delgado. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la estimulación de la captación de glucosa. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende el control/la estimulación de la secreción de somatostatina. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la reducción tanto de la ingesta de alimentos como la ganancia de peso corporal. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la reducción de la adiposidad. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la supresión del apetito. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la inducción de la anorexia. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención
- 45
- 50
- 55

comprende la reducción del peso corporal en sujetos con sobrepeso y obesos. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la inducción de cambios en los niveles de las hormonas adiposas leptina y adiponectina. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende el aumento del gasto de energía además de la disminución de la ingesta de energía en sujetos con sobrepeso y obesos. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención comprende la disminución de los triglicéridos en plasma y cuerpos cetónicos aumentados.

En una realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo, comprende la disminución de los triglicéridos en plasma y cuerpos cetónicos aumentados. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo comprende el aumento de la expresión de los genes gluconeogénicos *Pck1*, *Pgc1α*, y *Pdha1*. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo, comprende la disminución de agrupaciones hepáticas de acetil-CoA, el principal producto de la descarboxilación de piruvato, y malonil-CoA. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo, comprende la sobreexpresión de los genes que inducen la oxidación de ácidos grasos (FAO, por sus siglas en inglés) en el hígado, incluyendo *Fgf21* y *Cpt1a*. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo, comprende la regulación negativa de genes lipogénicos tales como *ChREBP*. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento agudo, comprende la sobreexpresión del gen *Ldlr*.

En una realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento crónico, comprende la disminución de los niveles de leptina. En otra realización, la actividad biológica de un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada de la invención, después del tratamiento crónico comprende el aumento de los niveles de b-hidroxibutirato.

En otra realización, un polímero de PEG está fijado al extremo amino o residuo de lisina de la oxintomodulina a través de Fmoc o FMS. En otra realización, los términos "fijado" y "enlazado" se utilizan indistintamente. En otra realización, el polímero de PEG está enlazado a la cadena lateral α-amino de OXM. En otra realización, el polímero de PEG está enlazado a la cadena lateral ε-amino de OXM. En otra realización, el polímero de PEG está enlazado a una o más cadenas laterales ε-amino de OXM. En otra realización, el polímero de PEG comprende un resto sulfhidrilo.

En otra realización, el PEG es lineal. En otra realización, el PEG está ramificado. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 200 a 200.000 Da. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 80.000 Da. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 40.000 Da. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.

En otra realización, una OXM de acción prolongada se prepara utilizando agentes de PEGilación, lo que significa cualquier derivado de PEG el cual es capaz de reaccionar con un grupo funcional tal como NH_2 , OH , SH , COOH , CHO , $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{PO}_2\text{Cl}$, $-(\text{CH}_2)_x\text{Hal}$, presente en el anillo de fluoreno del resto Fmoc o FMS. En otra realización, el agente de PEGilación se utiliza habitualmente en su forma mono-metoxilada, en donde solo un grupo hidroxilo en un extremo de la molécula de PEG está disponible para la conjugación. En otra realización, una forma bifuncional de PEG, en donde se pueden utilizar ambos extremos están disponibles para la conjugación si, por ejemplo, se desea obtener un conjugado con dos residuos de péptido o proteína fijados covalentemente a un resto PEG único.

En otra realización, los PEGs ramificados están representados como $\text{R}(\text{PEG-OH})_m$, en la cual R representa un resto de núcleo central tal como pentaeritritol o glicerol, y m representa el número de brazos de ramificación. El número de brazos de ramificación (m) puede variar de tres a cien o más. En otra realización, los grupos hidroxilo están sujetos a modificación química. En otra realización, las moléculas de PEG ramificado se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.113.906, N° 5.919.455, N° 5.643.575 y N° 5.681.567.

En otra realización, el resto PEG que no se fija directamente a la OXM, como en el procedimiento de pegilación estándar, sino más bien el resto PEG se fija a través de un enlazador tal como Fmoc o FMS. En otra realización, el enlazador es altamente sensible a las bases y es eliminable bajo condiciones básicas moderadas. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS es equivalentemente activa a la OXM libre. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS es más activa que la OXM libre. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS comprende diferente actividad que la OXM libre. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS, a diferencia de la OXM libre, tiene actividad del sistema nervioso central. En otra realización, la OXM PEGilada reversible cruza la barrera hemato-

encefálica y actúa sobre el hipotálamo para ejercer las actividades biológicas proporcionadas en la presente. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS, a diferencia de la OXM libre, no puede entrar en el cerebro a través de la barrera hemato-encefálica. En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS comprende una semivida de circulación prolongada en comparación con la OXM libre.

5 En otra realización, la OXM conectada a PEG a través de Fmoc o FMS pierde su resto PEG junto con el resto Fmoc o FMS, recuperando así la OXM libre.

En otra realización, R_2 , R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno y A es $-\text{OCO}-$, a saber, el radical 9-fluorenilmetoxycarbonilo (en lo que sigue "Fmoc"). En otra realización, R es $-\text{SO}_3\text{H}$ en la posición 2 del anillo de fluoreno, R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno y A es $-\text{OCO}-$, a saber el radical 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (en lo que sigue "FMS").

10 En otra realización, la pegilación de OXM y la preparación de los conjugados de (PEG-Fmoc)n-OXM o (PEG-FMS)n-OXM incluye fijar MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS al componente amina de OXM, obteniendo así un conjugado de MAL-FMS-OXM o MAL-Fmoc-OXM, y luego sustituyendo PEG-SH con el resto maleimida, produciendo el conjugado (PEG-FMS)n-OXM o (PEG-Fmoc)n-OXM, respectivamente.

15 En otra realización, la pegilación de OXM incluye hacer reaccionar MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS con PEG-SH, formando así un conjugado de PEG-FMS-NHS o PEG-Fmoc-NHS, y luego haciéndolo reaccionar con el componente amina de OXM, dando como resultado el conjugado de (PEG-FMS)n-OXM o (PEG-Fmoc)n-OXM deseado, respectivamente. En otra realización, la pegilación de péptidos/proteínas tal como OXM se describen en la Patente de Estados Unidos N° 7585837. En otra realización, la pegilación inversa de

20 péptidos/proteínas tal como OXM con Fmoc o FMS se describen en la Patente de Estados Unidos N° 7585837.

En otra realización, las frases "OXM de acción prolongada" y "OXM pegilada inversa" se utilizan indistintamente. En otra realización, la OXM pegilada inversa se compone de PEG-FMS-OXM y PEG-Fmoc-OXM en la presente identificada por las fórmulas: (PEG-FMS)n-OXM o (PEG-Fmoc)n-OXM, en donde n es un número entero de al menos uno, y OXM está enlazada al radical FMS o Fmoc a través de al menos un grupo amino.

25 En otra realización, sorprendentemente, la OXM de acción prolongada descrita en la presente es tanto activa en su forma pegilada como en su forma periférica. En otra realización, sorprendentemente, la construcción de (PEG-FMS)n-OXM o (PEG-Fmoc)n-OXM no vuelve inactivo a este conjugado. En otra realización, de manera sorprendente, la construcción de (PEG-FMS)n-OXM o (PEG-Fmoc)n-OXM no vuelve inactiva a la OXM.

Usos Terapéuticos

30 En otra realización, la presente invención proporciona PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden para uso para la prevención de la hiperglucemia, para mejorar el control glucémico, para el tratamiento de la diabetes mellitus seleccionada del grupo que consiste de diabetes mellitus no insulino dependiente (en una realización, diabetes Tipo 2), diabetes mellitus insulino dependiente (en una realización, diabetes de Tipo 1), o diabetes mellitus gestacional, o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para el tratamiento de la diabetes Tipo 2. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para aumentar la sensibilidad a la insulina. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para reducir la resistencia a la insulina.

40 En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la supresión del apetito. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de la saciedad. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción del peso corporal. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción de la grasa corporal.

45 En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción del índice de masa corporal. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción del consumo de alimentos. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el tratamiento de la obesidad. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el tratamiento de la diabetes mellitus asociada con la obesidad. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento del ritmo cardíaco. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento de la tasa metabólica basal (BMR, por sus siglas en inglés). En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento del gasto de energía. En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de tolerancia a la glucosa. En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de tolerancia a la glucosa. En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de tolerancia a la glucosa.

50 En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento del ritmo cardíaco. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento de la tasa metabólica basal (BMR, por sus siglas en inglés). En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el aumento del gasto de energía. En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de tolerancia a la glucosa. En otra realización, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción de tolerancia a la glucosa.

composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inducción del control glucémico. En una realización, el control glucémico se refiere a los niveles de glucosa en sangre no altos y/o no fluctuantes y/o niveles de hemoglobina glicosilada no altos y/o no fluctuantes.

En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la inhibición del aumento de peso. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción de los niveles de glucosa en sangre (Figuras 4A y 9). En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la disminución de la ingesta calórica. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la disminución del apetito. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el control del peso. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para inducir o promover la pérdida de peso. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el mantenimiento de una cualquiera o más de un peso corporal deseado, un índice de masa corporal deseado, una apariencia deseada y buena salud. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para el control de un perfil de lípidos. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción de los niveles de triglicéridos. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción de los niveles de glicerol (Figura 9D).

En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para la reducción de los niveles de colesterol. En una realización, la reducción de los niveles de colesterol es mayor que la reducción observada después de la administración de OXM nativa (Figura 9C). En una realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden disminuyen los niveles de colesterol en un 60-70 %. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden disminuyen los niveles de colesterol en un 50-100 %. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden disminuyen los niveles de colesterol en un 25-90 %. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden disminuyen los niveles de colesterol en un 50-80 %. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden disminuyen los niveles de colesterol en un 40-90 %. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para aumentar los niveles de colesterol HDL.

En una realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para los fines descritos en la presente sin una disminución significativa de la efectividad durante el transcurso de la administración (Figuras 5A, 6A y 7). En una realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 1 día. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 2-6 días. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 1 semana. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 2 semanas. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 3 semanas. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 4 semanas. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 6 semanas. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 2 meses. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 4 meses. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 6 meses. En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden siguen siendo efectivas durante 1 año o más.

En una realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden se pueden utilizar para los propósitos descritos en la presente y pueden ser efectivas inmediatamente después de la administración de la primera dosis (Figura 8A). En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden son efectivas después de que se hayan administrado dos o más dosis.

En otra realización, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que las comprenden como se describe anteriormente se pueden aplicar a un sujeto humano afectado con una enfermedad o afección que se puede aliviar, inhibir, y/o tratar por OXM.

En una realización, la OXM de la presente invención se puede utilizar en terapias que requieren que la OXM esté en una forma soluble. En otra realización, la OXM de la presente invención incluye uno o más aminoácidos polares, incluyendo serina y treonina, que son capaces de aumentar la solubilidad de la proteína debido a su

cadena lateral que contiene hidroxilo.

En una realización, la OXM de la presente invención se sintetiza bioquímicamente tal como utilizando técnicas en fase sólida estándar. En otra realización, estos métodos bioquímicos incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, o síntesis en solución clásica.

- 5 En una realización, los procedimientos de síntesis de OXM en fase sólida son bien conocidos por un experto en la técnica y se describen, además, por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Protein Syntheses* (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En otra realización, las proteínas sintéticas se purifican por cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.] y la composición de las cuales se puede confirmar a través de la secuenciación de aminoácidos por métodos conocidos por un experto en la técnica.

- 10 En otra realización, las técnicas de proteína recombinante se utilizan para generar la OXM de la presente invención. En algunas realizaciones, las técnicas de proteína recombinante se utilizan para la generación de grandes cantidades de la OXM. En otra realización, las técnicas recombinantes se describen por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984), *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, p. 421-463.

- 15 En otra realización, la OXM de la presente invención se sintetiza utilizando un polinucleótido que codifica OXM. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica OXM se liga en un vector de expresión, que comprende un control de la transcripción de una secuencia cis-reguladora (p. ej., secuencia promotora). En algunas realizaciones, la secuencia cis-reguladora es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de la OXM de la presente invención.

- 20 En una realización, la expresión "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble la cual se aísla y proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómica y/o una secuencia de polinucleótido compuesta (p. ej., una combinación de las anteriores).

- 25 En una realización, "secuencia de polinucleótido complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa del ARN mensajero utilizando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una realización, la secuencia se puede amplificar posteriormente *in vivo* o *in vitro* utilizando una ADN polimerasa.

- 30 En una realización, "secuencia de polinucleótido genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.

- 35 En una realización, "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el péptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre estas. En una realización, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señales de corte y empalme conservadas. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de la expresión de acción cis.

- 40 En una realización, los polinucleótidos se preparan utilizando técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento implica el ligamiento de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

- 45 Se puede utilizar una diversidad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión de huésped para expresar la OXM de la presente invención. En otra realización, estas incluyen microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN de plásmido o de ADN cósmido que contiene la secuencia codificante de proteína; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de proteína; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes, tal como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante de proteína.

- 50 En una realización, se utilizan sistemas de expresión no bacterianos (p. ej., sistemas de expresión de mamíferos tales como células CHO) para expresar la OXM de la presente invención. En una realización, el vector de expresión utilizado para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células de mamíferos es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina.

En otra realización, en los sistemas bacterianos, un cierto número de vectores de expresión se puede

seleccionar ventajosamente dependiendo del uso previsto para la proteína expresada. En una realización, se desean grandes cantidades de OXM. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado en el periplasma de la bacteria o el medio de cultivo donde el producto proteico se purifica fácilmente. En una realización, cierta proteína de fusión se modifica genéticamente con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación de la proteína. En una realización, los vectores adaptables a una manipulación de este tipo incluyen la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

En una realización, se utilizan sistemas de expresión de levadura. En una realización, un cierto número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles se pueden utilizar en la levadura como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 5,932,447. En otra realización, se utilizan vectores que fomentan la integración de secuencias de ADN extraño en el cromosoma de la levadura.

En una realización, el vector de expresión puede incluir, además, secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un ARNm único tal como un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) y secuencias para la integración genómica de la proteína promotora-quimérica.

En una realización, los vectores de expresión de mamíferos incluyen pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Stratagene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

En otra realización, los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus se utilizan por la presente invención. Vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En otra realización, los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y vectores derivados del virus de Epstein Bar incluyen pHEBO, y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permite que la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de la metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores, muestre efectividad para la expresión en células eucariotas.

En una realización, se utilizan vectores de expresión de plantas. En una realización, la expresión de la secuencia codificante del agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón (tal como OXM) es impulsada por un cierto número de promotores. En otra realización, se utilizan promotores virales tales como los promotores 35S ARN y 19S ARN de CaMV [Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)], o el promotor de cubierta proteica para TMV [Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987)]. En otra realización, se utilizan promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); y Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, p. ej., hsp17.5-E o hsp17.3-B de soya [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]. En una realización, construcciones se introducen en células vegetales utilizando el plásmido Ti, el plásmido Ri, vectores virales de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, p. 421-463 (1988)]. Otros sistemas de expresión tales como sistemas de células huésped de insectos y mamífero también se pueden utilizar por la presente invención.

Se apreciará que a diferencia del que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica la proteína), la construcción de expresión también puede incluir secuencias modificadas genéticamente para optimizar la estabilidad, producción, purificación, el rendimiento o la actividad de la proteína expresada.

Diversos métodos, en algunas realizaciones, se pueden utilizar para introducir el vector de expresión en el sistema de célula huésped. Métodos de este tipo se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, la transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véanse las Patentes de EE.UU. Nºs 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positiva-negativa.

En una realización, las células transformadas se cultivaron bajo condiciones efectivas, que permiten la expresión de grandes cantidades de OXM recombinante. En otra realización, las condiciones de cultivo efectivas incluyen condiciones efectivas de medios, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. En una realización, un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el cual una

célula se cultiva para producir la OXM recombinante de la presente invención. En otra realización, un medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. En una realización, las células de la presente invención se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. En otra realización, el cultivo se realiza a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En otra realización, las condiciones de cultivo están dentro de la pericia de un experto normal en la técnica.

En una realización, dependiendo del vector y el sistema huésped utilizados para la producción, la OXM resultante de la presente invención permanece dentro de la célula recombinante, se secreta en el medio de fermentación, se secreta en un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*, o se retiene en la superficie externa de una célula o membrana viral.

En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación de la OXM recombinante.

En una realización, la expresión "recuperación de la OXM recombinante" utilizada en la presente se refiere a la recogida del medio de fermentación completo que contiene la OXM y no necesariamente implica etapas adicionales de separación o purificación.

En una realización, la OXM de la presente invención se purifica utilizando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía en concanavalina A, cromatografía de exclusión y solubilización diferencial.

En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada se puede modificar genéticamente para codificar la proteína de la presente invención y el resto escindible condensado. En una realización, una proteína de fusión se puede diseñar de manera que la proteína se puede aislar fácilmente por cromatografía de afinidad; p. ej., por inmovilización sobre una columna específica para el resto escindible. En una realización, un sitio de escisión se modifica genéticamente entre la proteína y el resto escindible y la proteína se puede liberar de la columna cromatográfica mediante tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [p. ej., véase Booth et al., *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)]. En otra realización, la OXM de la presente invención se recupera en forma "sustancialmente pura". En otra realización, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso efectivo de la OXM en las aplicaciones descritas en la presente.

En una realización, el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón también se puede sintetizar utilizando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, los métodos de síntesis *in vitro* son bien conocidos en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

En otra realización, la actividad de unión *in vitro* se determina midiendo la capacidad del agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón nativo, recombinante y/o pegilado inverso como se describe en la presente, así como composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo para tratar o mejorar las enfermedades o afecciones tales como: diabetes mellitus, obesidad, trastornos de la alimentación, trastornos metabólicos, etc. En otra realización, la actividad *in vivo* se deduce por las medidas conocidas de la enfermedad que se está tratando.

En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa de la presente invención comprende de 0,005 a 0,1 miligramos/kg de péptido OXM. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa de la presente invención comprende de 0,005 a 0,5 miligramos/kg de péptido OXM. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa de la presente invención comprende de 0,05 a 0,1 microgramos de péptido OXM. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa comprende de 0,005 a 0,1 miligramos/kg de péptido OXM en una solución inyectable.

En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez al día. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 36 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 48 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 60 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 72 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 84 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 96 horas. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 5 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 6 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 7 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 8-10 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 10-12 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 12-15 días. En otra realización, una dosis de OXM pegilada inversa se administra una vez cada 15-25 días.

En otra realización, la OXM pegilada inversa de la presente invención se administra por una inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) una vez a la semana.

- 5 En otra realización, la OXM pegilada inversa de la presente invención se puede proporcionar al individuo per se. En una realización, la OXM pegilada inversa de la presente invención se puede proporcionar al individuo como parte de una composición farmacéutica en que se mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de OXM de acción prolongada como se describe en la presente con otros componentes químicos tales como soportes y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo. En otra realización, una OXM pegilada inversa es responsable del efecto biológico.

- 10 En otra realización, cualquiera de las composiciones de esta invención comprenderá al menos una OXM pegilada inversa. La presente invención se puede utilizar en preparaciones combinadas. "Una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los participantes en la combinación como se definió anteriormente se pueden dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los participantes en la combinación, es decir, simultánea, concurrente, separada o secuencialmente. Las partes del kit de partes, p. ej., luego se pueden administrar simultáneamente o espaciadas cronológicamente, es decir en diferentes momentos y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los participantes en la combinación, en algunas realizaciones, se puede administrar en la preparación combinada. En una realización, la preparación combinada se puede variar, p. ej., con el fin de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes a ser tratados o a las necesidades del paciente único, necesidades diferentes que pueden deberse a una enfermedad particular, la gravedad de una enfermedad, edad, sexo o peso corporal como se puede hacer fácilmente por una persona experta en la técnica.

- 25 En otra realización, las expresiones "soporte fisiológicamente aceptable" y "soporte farmacéuticamente aceptable", las cuales se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un soporte o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no merma la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye bajo estas expresiones. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el soporte farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidades en medios tanto orgánicos como acuosos (Mutter et al. (1979).

- 30 En otra realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de una OXM de acción prolongada. En una realización, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

- 35 Técnicas para la formulación y administración de fármacos se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

En otra realización, vías adecuadas de administración de los compuestos de la presente invención, por ejemplo, incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

- 40 La presente invención también proporciona el compuesto o la composición de la presente para uso como un medicamento. Ejemplos de vías periféricas incluyen administración oral, rectal, parenteral por ejemplo intravenosa, intramuscular, o intraperitoneal, mucosal, p. ej., bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo administración por inhalación. A continuación se dan cantidades de dosis preferidas de OXM para los medicamentos.

- 45 En una realización, la composición farmacéutica comprende una OXM pegilada inversa y un soporte farmacéuticamente adecuado, en una forma adecuada para la administración oral, rectal, parenteral, p. ej., intravenosa, intramuscular, o intraperitoneal, mucosal, p. ej., bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica, incluyendo la administración por inhalación. Si está en forma de dosificación unitaria, la dosis por unidad puede ser, por ejemplo, como se describe a continuación o como se calcula sobre la base de la dosis por kg dada más adelante.

- 50 En otra realización, la preparación se administra de una manera local antes que sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la preparación directamente en una zona específica del cuerpo de un paciente. En otra realización, una OXM pegilada inversa se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra realización, una OXM pegilada inversa se formula en una forma de dosificación inyectable.

- 55 Diversas realizaciones de intervalos de dosificación se contemplan por esta invención: el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal cada 3 días (solo el peso de la OXM dentro de la composición de OXM pegilada

inversa proporcionado como el tamaño del PEG puede diferir sustancialmente). En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal cada 7 días. En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal cada 10 días. En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal cada 14 días. En otra realización, de forma inesperada, la cantidad efectiva de OXM en una composición de OXM pegilada inversa es 1/4-1/10 de la cantidad efectiva de OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 50 % en comparación con la OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 70 % en comparación con la OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 75 % en comparación con la OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 80 % en comparación con la OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 85 % en comparación con la OXM libre. En otra realización, de forma inesperada, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM prescrita a un paciente en al menos un 90 % en comparación con la OXM libre.

En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal una vez cada 3 días (solo el peso de la OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa que se proporciona como el tamaño de PEG puede diferir sustancialmente). En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal una vez cada 7 días. En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal una vez cada 10 días. En otra realización, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal una vez cada 14 días.

En otra realización, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación efectiva al menos 2 veces como reduce la dosis semanal efectiva al menos 2 veces, limitando por lo tanto el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso de la terapia de OXM. En otra realización, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación efectiva al menos 3 veces como reduce la dosis semanal efectiva al menos 3 veces, limitando por lo tanto el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso de la terapia de OXM. En otra realización, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación efectiva al menos 4 veces como reduce la dosis semanal efectiva al menos 4 veces, limitando por lo tanto el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso de la terapia de OXM. En otra realización, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación efectiva al menos 5 veces como reduce la dosis semanal efectiva al menos 5 veces, limitando por lo tanto el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso de la terapia de OXM. En otra realización, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación efectiva al menos 6 veces como reduce la dosis semanal efectiva al menos 6 veces, limitando por lo tanto el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso de la terapia de OXM. En otra realización, la frecuencia de dosificación efectiva y dosis semanal efectiva se basan en: (1) el peso del componente de OXM administrado dentro de la composición de OXM pegilada inversa; y (2) el peso del componente de OXM administrado dentro de la composición de OXM libre (OXM no modificada).

En otra realización, se permite la reducción de la frecuencia de dosificación de OXM por pegilación inversa de OXM como se describe anteriormente en la presente. En otra realización, el término cumplimiento comprende la adherencia. En otra realización, aumentar el cumplimiento de los pacientes en necesidad de terapia de OXM incluye reducir la frecuencia de administración de OXM. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la OXM se logra gracias a la pegilación inversa que hace que la OXM sea más estable y más potente. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la OXM se logra como un resultado del aumento de T_{1/2} de la OXM. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la OXM se logra como resultado de la reducción del aclaramiento de la sangre de la OXM. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la OXM se logra como resultado del aumento de T_{1/2} de la OXM. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la OXM se logra como resultado del aumento de la medida de AUC de la OXM.

En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez al día. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada dos días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada cuatro días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada cinco días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada seis días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada semana. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada 7-14

días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada 5-15 días. En otra realización, una OXM pegilada inversa se administra a un sujeto una vez cada 15-30 días.

En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez al día. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada dos días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada cuatro días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada cinco días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada seis días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada semana. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 7-14 días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 5-15 días. En otra realización, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 15-30 días.

En una realización, variantes de OXM pegilada proporcionadas en la presente reducen de forma inesperada la glucosa junto con la reducción de los niveles de insulina en ayunas después de la administración de una dosis única de la variante de PEG-OXM. En otra realización, las variantes de OXM pegilada proporcionadas en la presente conducen al aumento de la sensibilidad de un sujeto a la insulina (véase el Ejemplo 6).

La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, pastillas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Formas de dosificación unitaria de este tipo comprenden una cantidad segura y efectiva de OXM de la invención, cada una de las cuales es, en una realización, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los soportes farmacéuticamente aceptables, adecuados para la preparación de formas de dosificación unitaria para la administración peroral, son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los comprimidos comprenden típicamente adyuvantes farmacéuticamente compatibles convencionales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes, tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes, tales como almidón, ácido alginico y croscarmelos; lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, se pueden utilizar deslizantes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla de polvo. En una realización, agentes colorantes, tales como los colorantes FD&C, se pueden añadir para la apariencia. Edulcorantes y agentes saborizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta piperita y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para los comprimidos masticables. Las cápsulas comprenden típicamente uno o más diluyentes sólidos arriba descritos. En algunas realizaciones, la selección de componentes de soporte depende de las consideraciones secundarias tales como el sabor, costo y estabilidad en estante, que no son críticas para los fines de esta invención, y se puede hacer fácilmente por una persona experta en la técnica.

En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos de liberación prolongada, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos de liberación lenta, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos de liberación inmediata, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado de la OXM de acción prolongada como se conoce por un experto en la técnica.

En otra realización, las composiciones para uso de acuerdo con esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que en otra realización son soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y efectiva de los compuestos de la presente invención y, opcionalmente, otros compuestos, destinados a la administración intranasal tópica. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10,0 % p/v de un compuesto objeto, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2,0, que se utiliza para la administración sistémica de los compuestos por vía intranasal.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intra-arterial, subcutánea o intramuscular de una preparación líquida. En otra realización, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intra-arterial y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intra-arterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies del cuerpo y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración

tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, se preparan y aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un soporte farmacéutico.

5 En una realización, composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican por procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

10 En una realización, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se formulan de manera convencional utilizando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares, que facilitan el procesamiento de OXM en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. En una realización, la formulación depende de la vía de administración elegida.

15 En una realización, los inyectables de la invención se formulan en soluciones acuosas. En una realización, los inyectables de la invención se formulan en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de sal fisiológica. En algunas realizaciones, para la administración transmucosal, los penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Penetrantes de este tipo son generalmente conocidos en la técnica.

20 En una realización, las preparaciones descritas en la presente se formulan para la administración parenteral, p. ej., por inyección de bolo o infusión continua. En otra realización, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En otra realización, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

25 Las composiciones también comprenden, en otra realización, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato de sodio y otros; tampones, tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol y otros; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de la viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y poli(alcohol de vinílico) y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, anestésicos locales u otros agentes activos. Las composiciones se pueden utilizar como sprays, nebulizaciones, gotas y similares.

30 En una realización, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de OXM de acción prolongada, en algunas realizaciones, se preparan como suspensiones de inyección oleosas o a base de agua apropiadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección contienen, en algunas realizaciones, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión también contiene estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de OXM de acción prolongada para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

40 En otra realización, el compuesto activo se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase generalmente *ibid.*).

45 En otra realización, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se utiliza una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med* 321:574 (1989). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos. En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad al objetivo terapéutico, es decir, el cerebro, requiriendo por lo tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

50 En una realización, la OXM de acción prolongada está en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., solución a base de agua estéril apirógena, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para administración por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un recipiente con medios de atomización adjuntos.

55 En una realización, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, p. ej., bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

En una realización, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde la OXM de acción prolongada está contenida en una cantidad efectiva para conseguir el fin pretendido. En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de OXM de acción prolongada efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o

5

prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

En una realización, la determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Las composiciones también pueden comprender conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato de sodio y otros; tampones, tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de la viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y poli(alcohol

10

15

vinílico) y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden anestésicos locales u otros agentes activos. Las composiciones se pueden utilizar como sprays, nebulizaciones, gotas y similares.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como soportes o componentes farmacéuticamente aceptables de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y fécula de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa, etil celulosa y metil celulosa de sodio; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles, tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes, tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes; agentes de formación de comprimidos, estabilizantes; antioxidantes; conservadores; agua apirógena; solución salina isotónica; y soluciones de tampón fosfato. La elección de un soporte farmacéuticamente aceptable a ser utilizado en unión con el compuesto se determina básicamente por la forma en que el compuesto será administrado. Si el compuesto objeto ha de ser inyectado, en una realización, el soporte farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, el pH de la cual se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

20

25

Además, las composiciones comprenden, además, aglutinantes (p. ej., acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (p. ej., almidón de maíz, fécula de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón de sodio), tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos, tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de la proteasa, tensioactivos (p. ej. lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (p. ej., glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (p. ej., hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (p. ej., carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma guar), edulcorantes (p. ej., aspartamo, ácido cítrico), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (p. ej., ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio), adyuvantes de flujo (p. ej., dióxido de silicio coloidal), plastificantes (p. ej. ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (p. ej., carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato de sodio), recubrimientos poliméricos (p. ej., poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (p. ej., etil celulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

35

40

Componentes típicos de soportes para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, agentes de suspensión típicos incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa (p. ej., Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato de sodio; agentes humectantes típicos incluyen lecitina y poli(óxido de etileno) sorbitán (p. ej., polisorbato 80). Conservantes típicos incluyen metilparabeno y benzoato de sodio. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saborizantes y colorantes arriba descritos.

45

50

Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fantasmas de eritrocitos, o esferoplastos). Composiciones de este tipo influirán en el estado físico, la solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de depuración *in vivo*.

55

También comprendidas por la invención están las composiciones en partículas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra los receptores, ligandos o antígenos específicos de tejido o acoplado a ligandos de receptores específicos de tejido.

En otra realización, los compuestos modificados presentan semividas sustancialmente más largas en la sangre después de inyección intravenosa que lo que hacen los compuestos no modificados correspondientes. En una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen considerablemente la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica *in vivo* deseada se logra mediante la administración de aductos de compuesto polimérico de este tipo con menos frecuencia o en dosis menores que con el compuesto no modificado.

En otra realización, la preparación de una cantidad o dosis efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, se puede formular una dosis en modelos animales y una información de este tipo se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica del agonista de acción prolongada (tal como OXM) como se describe en la presente se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificaciones para uso en seres humanos. En una realización, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una realización, la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación se pueden elegir por el médico individual a la vista de la condición del paciente. [Véase, p. ej., Fing1, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1].

En una realización, dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, durando el curso de tratamiento desde varios días a varias semanas o hasta que se consiga la cura o se logre la disminución del estado de la enfermedad.

En una realización, la cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que esté siendo tratado, de la gravedad de la afección, de la manera de administración, del juicio del médico que prescribe, etc.

En una realización, composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un soporte farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada.

En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se administra a través de la administración sistémica. En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se administra por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En otra realización, un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente es una preparación liofilizada (es decir, secada por congelación) en combinación con excipientes y estabilizadores orgánicos complejos tales como agentes tensioactivos no iónicos (es decir, surfactantes), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina de suero humano. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en PBS estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en NaCl al 0,9 % estéril para inyección.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente y soportes complejos tales como albúmina de suero humano, polioles, azúcares y agentes estabilizadores tensioactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, el documento WO 89/10756 (Hara et al. - que contiene poliol y p-hidroxibenzoato). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado inverso como se describe en la presente y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente y aminoácidos, tales como arginina o glutamato, que aumentan la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente y glicina o albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés), un tampón (p. ej., acetato) y un agente isotónico (p. ej., NaCl). En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente y tampón fosfato, glicina y HSA.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se estabiliza cuando se coloca en

soluciones tamponadas que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7,2. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se estabiliza con un aminoácido como agente estabilizante y, en algunos casos, una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

- 5 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente 0,3 % y 5 % en peso que es un aminoácido.

- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente proporciona precisión de dosificación y seguridad del producto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente proporciona una formulación líquida estable y biológicamente activa para uso en aplicaciones inyectables. En otra realización, la composición farmacéutica comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso no liofilizado como se describe en la presente.

- 15 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un largo período de tiempo en un estado líquido que facilita el almacenamiento y envío antes de la administración.

- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de la matriz. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de la matriz. En otra realización, la producción de micropartículas de lípidos por solidificación por pulverización se describió por Speiser (Speiser et al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguido de nanogránulos de lípidos para la administración peroral (Speiser documento EP 0167825 (1990)). En otra realización, los lípidos, los cuales se utilizan, son bien tolerados por el cuerpo (p. ej., glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para la nutrición parenteral).

- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente está en la forma de liposomas (J. E. Diederichs et al., Pharm./nd. 56 (1994) 267-275).

- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende liposomas. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una OXM pegilada o pegilada inversa como se describe en la presente comprende una emulsión de lípidos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende microesferas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas de lípidos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas de lípidos que comprenden lípidos anfifílicos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas de lípidos que comprenden un fármaco, una matriz lipídica y un tensioactivo. En otra realización, la matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es al menos 50 % p/p.

- Las composiciones de la presente invención se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón de acción prolongada. El envase puede comprender una lámina metálica o plástica, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede estar alojado mediante un anuncio relacionado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, anuncio que es un reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Un anuncio de este tipo puede ser un etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para la prescripción de fármacos o de una inserción de producto aprobado.

Se apreciará que el agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón pegilado o pegilado inverso de la presente invención se puede proporcionar al individuo con agentes activos adicionales para lograr un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada uno de los agentes por sí mismo. En otra realización, se toman medidas (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) para evitar los efectos secundarios asociados a las terapias combinadas..

Objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Técnicas de este tipo se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se recogen en las Patentes de EE.UU. N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°s 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" URL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

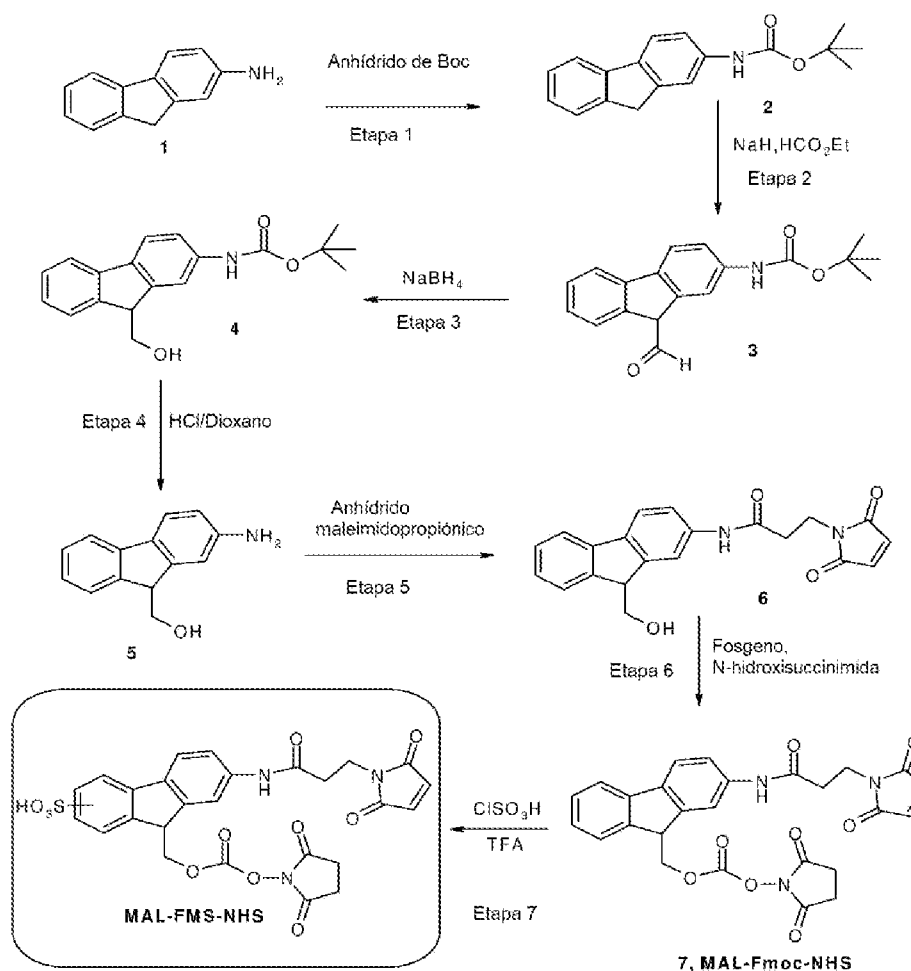
Síntesis de PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-FMS-OXM

Síntesis de OXM: Oxintomodulina de secuencia: HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNIA (SEQ ID NO: 1) se sintetizó por el método en fase sólida empleando la estrategia de Fmoc en todo el ensamblaje de la cadena de péptido (Almac Sciences, Escocia). La secuencia peptídica se ensambló utilizando las siguientes etapas: (1) Protección: la resina fue tapada utilizando solución de anhídrido acético 0,5 M (Fluka) en DMF (Rathburn); (2) Desprotección: el grupo protector Fmoc se eliminó de la cadena peptídica en crecimiento utilizando solución de piperidina al 20 % v/v (Rathburn) en DMF (Rathburn); y (3) Acoplamiento de Aminoácidos: la solución de aminoácido 0,5 M (Novabiochem) en DMF (Rathburn) se activó utilizando solución de HOBt 1 M (Carbosynth) en DMF (Rathburn) y solución de DIC 1 M (Carbosynth) en DMF (Rathburn). Se utilizaron cuatro equivalentes de cada uno de los aminoácidos por acoplamiento.

El péptido bruto se escindió de la resina, y los grupos protectores se eliminaron mediante agitación en un cóctel de triisopropilsilano (Fluka), agua, sulfuro de dimetilo (Aldrich), yoduro de amonio (Aldrich) y TFA (Applied Biosystems) durante 4 horas. El péptido bruto se recogió después por precipitación a partir de éter dietílico frío.

Purificación del péptido: El péptido bruto se disolvió en acetonitrilo (Rathburn)/agua (Milli-Q) (5:95) y se cargó en la columna de HPLC preparativa. Los parámetros cromatográficos son los siguientes: Columna: Phenomenex Luna C18 250 mm x 30 mm, 15 µm, 300 Å; Fase móvil A: agua + TFA al 0,1 % v/v (Applied Biosystems); Fase móvil B: acetonitrilo (Rathburn) + TFA al 0,1 % v/v (Applied Biosystems); Detección UV: 214 o 220 nm; Gradiente: 25 % B a 31 % B en 4 volúmenes de columna; y caudal de 43 mL/min.

Etapa 2 – Síntesis del Enlazador - Síntesis del Enlazador MAL-FMS-NHS:



La síntesis de los compuestos 2-5 se basó en los procedimientos descritos por Albericio et al. en Synthetic Communication, 2001, 31(2), 225-232.

- 5 2-(Boc-amino)fluoreno (2): 2-aminofluoreno (18 g, 99 mmol) se suspendió en una mezcla de dioxano:agua (2:1) (200 ml) y NaOH 2 N (60 ml) en un baño de hielo con agitación magnética. Luego se añadió Boc_2O (109 mmol, 1,1 eq), y se continuó la agitación a TA. La reacción se vigiló por TLC ($R_f = 0,5$, Hexano/Acetato de Etilo 2:1), y el pH se mantuvo entre 9-10 mediante la adición de NaOH 2N. Después completarse la reacción, la suspensión se acidificó con KHSO_4 1 M a pH = 3. La fase sólida se filtró y se lavó con agua fría (50 ml), dioxano-agua (2:1) y luego se azeotropó con tolueno dos veces antes de usarla en la siguiente etapa.
- 10 9-Formil-2-(Boc-amino)fluoreno (3): En un RBF (siglas inglesas de matraz de fondo redondo) de 3 bocas, el NaH (60 % en aceite; 330 mmol, 3,3 eq) se suspendió en THF seco (50 ml) y se añadió gota a gota una solución de 2-(Boc-amino)fluoreno de la etapa 2 (28 g; 100 mmol) en THF seco (230 ml) a lo largo de 20 minutos;. Se observó una suspensión amarilla espesa, y la mezcla se agitó durante 10 minutos a TA bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota formiato de etilo (20,1 ml, 250 mmol, 2,5 eq) (precaución: emisión de gas). La suspensión se volvió una solución marrón pálida. La solución se agitó durante 20 minutos. La reacción se vigiló por TLC ($R_f = 0,5$, Hexano/Acetato de etilo 1:1) y cuando se observaron solo trazas de material de partida, se inactivó con agua helada (300 ml). La mezcla se evaporó bajo presión reducida hasta que la mayor parte del THF se había eliminado. La mezcla resultante se trató con ácido acético a pH = 5. El precipitado blanco obtenido se disolvió en acetato de etilo y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y toda la capa orgánica se combinó y se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera y se secó sobre MgSO_4 . Después de la filtración y eliminación del disolvente, se obtuvo un sólido amarillo. Este material se utilizó en la siguiente etapa.
- 15 9-hidroximetil-2-(Boc-amino)fluoreno (4): El compuesto 3 se suspendió en MeOH (200 ml) y se añadió en porciones borohidruro de sodio a lo largo de 15 minutos. La mezcla se agitó durante 30 minutos (precaución: reacción exotérmica y emisión de gas). La reacción se vigiló por TLC ($R_f = 0,5$, Hexano/EtOAc 1:1) y se completó. Se añadió agua (500 ml) y el pH se ajustó a 5 con ácido acético. El tratamiento implicó la extracción dos veces con acetato de etilo, el lavado de las capas orgánicas combinadas con bicarbonato de sodio y salmuera, el secado sobre MgSO_4 , la filtración y la concentración a sequedad. El producto bruto obtenido se purificó por cromatografía de resolución rápida utilizando Heptano/EtOAc (3:1), produciendo una espuma
- 25

amarilla (36 g, 97,5 % de pureza, trazas de acetato de etilo y éter dietílico observadas en la ^1H -RMN).

9-hidroximetil-2-aminofluoreno (5): el compuesto 4 se añadió a una solución enfriada con hielo de HCl 4 N en dioxano. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la TA y se agitó durante la noche. Se obtuvo un precipitado amarillo pálido. La suspensión se enfrió a 0 °C y se agitó adicionalmente durante 5 horas. Después de este tiempo, el sólido se filtró y se lavó a fondo con DCM (5 x 30 ml). Después del secado, se obtuvo un sólido amarillo pálido (20 g, 96,5 % de pureza) con un rendimiento total de 80 % a lo largo de 3 etapas.

9-hidroximetil-2-(amino-3-maleimidopropionato)fluoreno (6): 9-hidroximetil-2-aminofluoreno (5,5 g, 26 mmol) y anhídrido maleimidopropiónico (6,93 g, 26 mmol) se colocaron en un RBF de 250 ml equipado con un agitador, un condensador de reflujo y un burbujeador de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 85 °C durante 25 horas. La TLC (R_f = 0,25, hexano/EtOAc 1:4) mostró la terminación de la reacción después de este tiempo. La mezcla de reacción se concentró en vacío para proporcionar un sólido amarillo. El producto se purificó mediante cromatografía en columna.

MAL-Fmoc-NHS (7): Un RBF de 500 ml limpio y seco con agitación en la parte superior se cargó con trifosgeno (1,58 g, 0,35 eq.) en THF seco (55 ml) para formar una solución a temperatura ambiente. La solución se enfrió a aproximadamente 0 °C con un baño de hielo/agua, y una solución de NHS (0,67 g, 0,38 eq) en THF seco (19 ml) se añadió gota a gota durante 10 minutos bajo nitrógeno a 0 °C. La solución resultante se agitó durante 30 minutos. Se añadió gota a gota una porción adicional de NHS (1,34 g, 0,77 eq) en THF seco (36 ml) a 0 °C durante 10 minutos y se agitó durante 15 minutos.

El compuesto 6 (5,5 g, 1 eq), THF seco (55 ml) y piridina (3,07 ml, 2,5 eq) se agitaron juntos para formar una suspensión. Esto se añadió a la solución de NHS en porciones a 0-5 °C y luego se dejó ir a TA eliminando el baño de hielo. Después de 20 horas, se detuvo la reacción (material de partida todavía presente, si la reacción es empujada hasta su terminación se ha observado una impureza atenuadora). La mezcla de reacción se filtró y al filtrado se añadieron salmuera al 4 % (200 ml) y EtOAc (200 ml). Después de la separación, la capa orgánica se lavó con ácido cítrico al 5 % (220 ml) y agua (220 ml). La capa orgánica se concentró luego para dar 7,67 g de MAL-Fmoc-NHS cruda. El material se purificó por cromatografía en columna utilizando un gradiente de ciclohexano/EtOAc 70:30 a 40:60. Las fracciones que contienen el producto se concentraron en vacío para dar 3,47 g (45 %) de MAL-Fmoc-NHS.

MAL-FMS-NHS (reacción de ensayo): a una solución de MAL-Fmoc-NHS (100 mg, 0,2 mmol) en ácido trifluoroacético (10 ml) se añadió ácido clorosulfónico (0,5 ml). Después de 15 minutos, se añadió éter dietílico enfriado con hielo (90 ml) y el producto se precipitó. El material se recogió por centrifugación, se lavó con éter dietílico y se secó en vacío. Se obtuvieron 41,3 mg (35 %) de un sólido beige.

Etapas 3 - Conjugación

Conjugación de PEG-Fmoc-OXM: La conjugación con PEG, Fmoc y OXM se realizó en una relación molar de 1:1:1, p. ej., PEG40-SH (44 mg, en 4,4 ml de agua equivalente a 1,0 μmol) se añadió al péptido (4,5 mg, equivalente a 1,0 μmol) y se añadió NaHCO_3 (1 M, 0,1 ml). Fmoc (Almac, 10 mg/ml en DMF, 50 μl) se añadió con agitación. La reacción se agitó durante 24 h a TA.

Conjugación de PEG-FMS-OXM: Todas las conjugaciones se realizaron a una relación molar 1:1:1 entre el PEG, el enlazador y OXM con los siguientes reactivos: PEG₄₀-SH y PEG₃₀-SH (NOF), FMS (Almac), EMCS (Termo Scientific), OXM (Almac). PEG₄₀-SH se disolvió en tampón fosfato de sodio 0,1 M (Sigma) pH 7,2 a una concentración de 10 mg/mL. La solución se añadió a un equivalente de péptido OXM purificado (Almac). El enlazador MAL-FMS-NHS (Almac) se disolvió en DMF a una concentración de 10 mg/mL, se añadió un equivalente a la reacción. La mezcla se agitó durante 30 minutos. La solución se neutralizó a pH 4 utilizando ácido acético glacial (Fisher). La mezcla neutralizada se filtró (0,45 μm) y se separó utilizando cromatografía preparativa. La mezcla de reacción se filtró y se purificó por HPLC preparativa (Phenomenex Luna C18), se liofilizó y se almacenó congelada.

Los parámetros cromatográficos fueron los siguientes: Columna: Phenomenex Luna C18(2) 250 mm x 30 mm, 15 μm prep., 100 Å; Fase móvil A: agua (Milli-Q) + TFA al 0,1 % v/v (Applied Biosystems); Fase móvil B: agua/acetonitrilo (Rathburn) (25:75) + TFA al 0,1 % v/v (Applied Biosystems); Detección UV: 214 nm; Gradiente: 10 % B a 65 % B durante 41 minutos; y Caudal: 43 mL/min.

El contenido de OXM se determinó utilizando análisis de aminoácidos (AAA) o hidrólisis básica. Una cantidad definida de conjugado de OXM liofilizado se disolvió en agua a una concentración de 20 mg/mL. Luego se determinó la absorbancia a 280 nm, y la concentración de acuerdo con la absorbancia a 280 nm se calculó utilizando $\epsilon_{280} = 29.700$. La concentración del péptido se cuantificó con precisión por hidrólisis con ácido de una parte alícuota seguida de análisis cuantitativo de aminoácidos; la fracción ideal es una que tiene una estrecha concordancia entre la absorbancia calculada a 280 nm y el contenido de péptido.

Inducción del ensayo basado en células cAMP

Células CHO-K1 que sobre-expresan el receptor de GLP-1 (Millipore HTS163C2) se sembraron en una placa blanca de área media de 96 pocillos (Greiner) a una densidad de 200.000 células/ml y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de OXM (ALMAC), PEG40-EMCS-OXM y PEG40-Fmoc-OXM con o sin suero de rata al 1 % (Bio reclamation). Las concentraciones de cAMP de las células se cuantificaron mediante el ensayo de HTRF (Cisbio 62AM4PEB) y el parámetro CE50 se analizó por el software PRISM.

Estudio farmacocinético

El perfil farmacocinético de PEG₄₀-Fmoc-OXM se evaluó de la siguiente manera: A ratas Wistar macho se les administró por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC) una dosis única de OXM nativa (n = 9, 278 µg/kg) o con PEG₄₀-Fmoc-OXM (n = 6, 278 µg/kg de equivalente de péptido). Las cohortes de 3 animales por grupo se sangraron a momentos alternados. La concentración en suero de OXM se analizó utilizando un kit de ELISA comercial (Cat nº S-1393, Bachem).

Ensayo de tolerancia a la glucosa IP

Ratones C57BL/6 machos se mantuvieron en ayunas durante la noche y se pesaron, y los niveles de glucosa en sangre se midieron por muestreo de la vena de la cola utilizando un glucómetro portátil. A los ratones se les inyectaron IP PBS (vehículo), OXM (333 nmol/kg), PEG₄₀-EMCS-OXM (OXM pegilada no reversible, 333 nmol/kg de contenido de péptido por peso corporal) y PEG₄₀-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido por peso corporal) y PEG₄₀-OSU (546 nmol/kg) como control. La glucosa (1,5 g/kg) se administró IP ya sea 15 min después de la administración del artículo de ensayo (vehículo, OXM y PEG₄₀-Osu) o 120 min después de la administración de PEG₄₀-Fmoc-OXM. Los niveles de glucosa en sangre se midieron por muestreo en la vena de la cola antes de la administración de glucosa y 10, 20, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa utilizando un glucómetro portátil.

Modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta

Estudio 1: ratones C57BL/6J (4-6 semanas de edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido) fueron alojados en grupo a su llegada en jaulas de polipropileno. Todos los animales tuvieron libre acceso a una dieta de alto contenido en grasas (D12451; 45 % de kcal derivadas de la grasa; Research Diets, New Jersey, EE.UU.) y agua del grifo en todo momento. Los animales se mantuvieron en un ciclo de fase normal de 12 h luz-oscuridad (luces encendidas a las 07:00). Los animales se expusieron a la dieta apropiada durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal promedio fue de aproximadamente 50 g). Posteriormente, los animales fueron alojados individualmente en jaulas de polipropileno durante un período adicional de dos semanas y se colocaron en la iluminación de fase inversa (luces apagadas durante 8 h desde las 09:30-17:30 h). Durante la segunda semana de alojamiento individual, los animales comenzaron un protocolo de manipulación una vez al día y un período de referencia de 7 días. Posteriormente, a los ratones se les dosificó vehículo o fármaco de ensayo como se da a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1

Grupo	Tratamiento (sc)	Frecuencia	n
A	Vehículo (PBS)	b.i.d	10
B	OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (PBS)	b.i.d	10
C	Sibutramina 20 mg/kg (PBS)	b.i.d	10
D	PEG40-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 3, 5, 7	10
E	556 mg/kg (27,8 mg/ml) PEG-SH (tampón citrato)	Días 1, 3, 5, 7	10

Las mediciones del peso corporal y de la ingesta de alimentos se realizaron diariamente hasta el Día 8. La medición final de peso corporal se realizó el Día 12. OXM y sibutramina se formularon en PBS, mientras que PEG40-FMS-OXM y PEG-SH se formularon en NaCl 147 mM, tampón citrato 10 mM pH 6. El contenido de OXM en PEG40-FMS-OXM se determinó por hidrólisis básica.

Estudio 2: El Estudio 2 se realizó como se describe para el Estudio 1. Después de un período de referencia, a los animales se les dosificó de acuerdo con el siguiente diseño descrito en la Tabla 2:

Tabla 2

Grupo	Tratamiento (sc)	Frecuencia	n
A	Vehículo (PBS)	b.i.d	8
B	OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (PBS)	b.i.d	8
C	PEG40-FMS-OXM 1000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
D	PEG40-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
E	PEG40-FMS-OXM 8000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 7	9
F	PEG40-EMCS-OXM 1000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
G	PEG40-EMCS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
H	PEG40-EMCS-OXM 8000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 7	9
I	PEG30-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
J	PEG40-SH (tampón citrato)	Días 1, 4, 7	9
K	Sibutramina	b.i.d	8

Las mediciones del peso corporal y de la ingesta de alimentos se realizaron diariamente hasta el Día 14.

Estudio 3: El Estudio 3 se realizó como se describe para el Estudio 1 y 2 con una diferencia, los ratones al comienzo del experimento pesaron 45-46 g. Después de un período de referencia, los animales fueron dosificados de acuerdo con el siguiente diseño descrito en la Tabla 3:

Tabla 3

Grupo	Tratamiento (sc)	n
A	PEG5-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Días 1, 8, 15	7
B	PEG30-FMS-6000 nmol/kg: Días 1, 8, 15	7
C	PEG40-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Días 1, 8, 15	7
D	PEG60-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Días 1, 8, 15	7
E	Vehículo (PBS sc)	7
F	Liraglutida (200 µg/kg bid) en PBS	7

Datos y análisis estadístico

10 OXM y Sibutramina se formularon en PBS, mientras que PEG40-EMCS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG-SH se formularon en NaCl 147 mM, tampón citrato 10 mM pH 6. El contenido de OXM en PEG40-FMS-OXM y PEG40-EMCS-OXM se determinaron por AAA.

15 El peso corporal y la ingesta de alimentos se expresaron como valores medios \pm EMT. Los datos de peso corporal, ganancia de peso corporal, ingesta de alimentos diaria y promedio e ingesta de alimentos acumulada se analizaron por ANCOVA con el valor de referencia como covariable, seguido de comparaciones apropiadas (dos colas) para determinar diferencias significativas del grupo de control. $P < 0,05$ se consideró que es estadísticamente significativo. El valor de referencia fue el valor del Día 1 para el peso corporal o el consumo promedio de agua o alimentos durante el período de referencia.

EJEMPLO 1

Síntesis y caracterización de PEG-Fmoc-OXM

20 Péptido OXM se sintetizó por el método en fase sólida empleando la estrategia de Fmoc en todo el ensamblaje de la cadena peptídica. El péptido se purificó por HPLC preparativa utilizando la columna Phenomenex Luna C18 (250 x 30 mm) aplicando el gradiente entre la solución A (TFA al 0,1 % + H₂O) y B (TFA al 0,1 % + MeCN).

La pureza del péptido fue superior al 95 %, el peso molecular fue de 4449 Da (medido por MALDI). La conjugación del péptido OXM con PEG₄₀-SH a través del enlazador Fmoc se realizó en presencia de NaHCO₃. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a TA, seguido de filtración y purificación por HPLC preparativa (Jupiter C5). El peso molecular del conjugado se analizó por MALDI y el contenido de péptido OXM se analizó por AAA. El contenido promedio de péptido OXM fue 189 µg de OXM por cada 1 mg de conjugado PEG₁₀-Fmoc-OXM, 132,4 µg de OXM por cada 1 mg de conjugado PEG₂₀-Fmoc-OXM, 61,7 µg de OXM por cada 1 mg de conjugado PEG₄₀-Fmoc-OXM y 40 µg de OXM por cada 1 mg de conjugado PEG₄₀-FMS-OXM.

EJEMPLO 2

Perfil farmacocinético de PEG₁₀-Fmoc-OXM, PEG₂₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-Fmoc-OXM en comparación con OXM nativa

El perfil farmacocinético de OXM en comparación con PEG₁₀-Fmoc-OXM y PEG₂₀-Fmoc-OXM se evaluó en ratas Wistar macho. A los animales se les administró con una inyección SC única de OXM nativa (278 µg/kg de péptido), PEG₁₀-Fmoc-OXM (278 µg/kg de contenido de péptido) o PEG₂₀-Fmoc-OXM (278 µg/kg de contenido de péptido). Se midió la concentración en suero del compuesto a los intervalos de tiempo indicados (ELISA comercial, el perfil PK se muestra en la Figura 1 y los parámetros PK no compartimentales convencionales se resumen en la Tabla 3). La pegilación reversible de OXM conjugada tanto con PEG₁₀ como con PEG₂₀ resultó en la prolongación de la semivida de OXM nativa (0,15 h para OXM nativa; 16,16 h para PEG₁₀-Fmoc-OXM y 27,38 h para PEG₂₀-Fmoc-OXM). La exposición como se reflejó por el parámetro de AUC, se incrementó aproximadamente ~450 veces para PEG₁₀-Fmoc-OXM y aproximadamente ~2210 para PEG₂₀-Fmoc-OXM. Por lo tanto, la conjugación reversible de OXM a PEG₂₀ resultó en un efecto más prolongado en comparación con PEG₁₀. Con el fin de caracterizar adicionalmente el perfil PK de OXM conjugada de forma reversible con PEG₄₀ a través del enlazador Fmoc, a ratas Wistar macho se les inyectó IV o SC OXM nativa o PEG₄₀-Fmoc-OXM (278 µg/kg de contenido de péptido) y la concentración en suero en los momentos indicados se analizó (utilizando ELISA comercial, el perfil PK se muestra en la Figura 2 y los parámetros PK no compartimentales convencionales se resumen en la Tabla 4). Los resultados indicaron que la pegilación reversible prolonga la semivida del péptido OXM en 100 veces, y aumenta la exposición significativamente como se refleja por el parámetro de AUC. Además, la biodisponibilidad del péptido nativo fue solo 4,37 %, mientras que la administración de PEG₄₀-Fmoc-OXM resultó en 84 % de biodisponibilidad.

Tabla 3: Parámetros PK no compartimentales de OXM y PEG₁₀-Fmoc-OXM y PEG₂₀-Fmoc-OXM después de la administración SC en ratas.

	AUC h*ng/ml	T1/2 term. h	MRT h
OXM	3,2	0,15	0,3
PEG ₁₀ -Fmoc-OXM	1456	16,16	20,6
PEG ₂₀ -Fmoc-OXM	7079	27,38	37,2

Tabla 4: Parámetros PK de OXM y PEG₄₀-Fmoc-OXM después de la administración IV o SC en ratas.

	Vía de Administración	AUC h*ng/ml	T1/2 term. h	MRT h	F %
OXM	IV	72,44	0,44	0,414	100
	SC	3,34	0,69	0,913	,374
PEG ₄₀ -Fmoc-OXM	IV	435,73	23,3	24,3	100
	SC	656,65	30,4	57,7	4,68

EJEMPLO 3

Inducción de cAMP por OXM y OXM pegilada reversible

Con el fin de evaluar la actividad in vitro de la OXM en comparación con PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-EMCS-OXM (OXM PEGilada no reversible), células CHO-K1 que sobre-expresan el receptor de GLP-1 se incubaron

con concentraciones crecientes de los diferentes compuestos seguidos por cuantificación de cAMP. La OXM nativa demostró actividad mejorada en comparación con PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-EMCS-OXM que tuvo actividad comparable in-vitro (CE50 de $2,53 \times 10^{-9}$, $2,07 \times 10^{-6}$ y $5,87 \times 10^{-7}$ para OXM, PEG₄₀-EMCS-OXM y PEG₄₀-Fmoc-OXM, respectivamente, Figura 3). De manera importante, la pegilación de OXM no abrogó completamente la activación del receptor de GLP-1 inducida por OXM. Además, mientras que la incubación de OXM en suero resultó en una actividad reducida, probablemente debido a la proteólisis parcial del péptido, las actividades comparables en la presencia y ausencia de suero de rata se obtuvieron para PEG₄₀-Fmoc-OXM y PEG₄₀-EMCS-OXM, lo que sugiere que la pegilación enmascara los sitios de proteólisis potenciales en la OXM.

EJEMPLO 4

Tolerancia a la glucosa inducida por OXM pegilada reversible de acción prolongada

Con el fin de evaluar la actividad in vivo de la OXM o PEG₄₀-Fmoc-OXM, se aplicó el modelo IPGTT. A ratones C57BL/6 en ayunas durante la noche se les inyectó IP péptido OXM o PEG₄₀-Fmoc-OXM seguido de inyección IP de glucosa y medición de los niveles de glucosa en sangre de la vena de la cola por glucómetro. OXM (333 nmol/kg), PEG₄₀-EMCS-OXM (OXM pegilada no reversible, 333 nmol/kg de contenido de péptido por peso corporal) y PEG₄₀-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido por peso corporal) se administraron IP 15 min (OXM y PEG₄₀-EMCS-OXM) o 2 h PEG₄₀-Fmoc-OXM, antes de la inyección IP de glucosa (1,5 g/kg). La inducción de la tolerancia a la glucosa se comparó con el grupo de vehículo. Como control para el efecto de PEG₄₀, a un grupo de control se administró PEG₄₀-Osu (546 nmol/kg). Mientras que el péptido OXM tuvo un efecto menor sobre la tolerancia a la glucosa en comparación con el grupo de vehículo, la administración de PEG₄₀-Fmoc-OXM que tiene incluso menor contenido molar de OXM resultó en tolerancia a la glucosa inducida (Figura 4). Sorprendentemente, la administración de OXM pegilada no reversible resultó en la inducción de la tolerancia a la glucosa lo que sugiere que la OXM pegilada es farmacológicamente activa in vivo.

EJEMPLO 5

OXM pegilada reversible de acción prolongada reduce el peso corporal e inhibe la ingesta de alimentos en ratones DIO

La actividad farmacológica de OXM se evaluó adicionalmente en ratones DIO después de la inyección SC de OXM nativa y OXM pegilada de forma reversible. En el estudio 1, a ratones DIO macho (n = 10 por grupo) se les administraron 5000 nmol/kg de peso corporal de OXM b.i.d o PEG₄₀-FMS-OXM que contiene 5000 nmol/kg de OXM por peso corporal cada dos días durante siete días de dosificación. El peso corporal y la ingesta de alimentos se midieron diariamente durante 8 días con una medición final del peso corporal el día 12. La inyección dos veces al día de OXM resultó en una reducción moderada tanto del peso corporal (6 % de pérdida de peso el Día 8 en comparación con el grupo de control de vehículo) como la inhibición estadísticamente significativa de la ingesta de alimentos. Por otra parte, la administración de PEG₄₀-FMS-OXM que tiene el mismo contenido de péptido OXM por dosis, pero inyectado cada dos días, resultó en una marcada pérdida de peso (24 % de pérdida de peso el Día 8 en comparación con el grupo de control de PEG-SH) y manifestó una inhibición sustancial de la ingesta de alimentos (Figura 4). Sibutramina, un inhibidor de la recaptación de neurotransmisores, que se utilizó como control positivo redujo el peso corporal en un 15,6 %. De señalar, la reducción del peso corporal en el grupo PEG₄₀-FMS-OXM fue consistente hasta la última medición el Día 12, que es de 5 días después de la última dosis, lo que indica un comportamiento de larga duración de la OXM pegilada de forma reversible (Figura 5).

Puesto que PEG₄₀-EMCS-OXM indujo la tolerancia a la glucosa en el modelo IPGTT, fue importante comparar la eficacia de OXM pegilada no reversible con OXM pegilada de forma reversible en el contexto del peso corporal y la ingesta de alimentos. En consecuencia, se diseñó un estudio de seguimiento para hacer frente a este problema (estudio 2 en materiales y métodos). Mientras que la administración de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG₄₀-FMS-OXM cada 3 días (total de 3 inyecciones) resultó en una reducción sustancial del peso corporal, la inyección de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG₄₀-EMCS-OXM en la misma frecuencia resultó en un efecto despreciable sobre el peso corporal. Sorprendentemente, la inyección única el Día 1 de 8000 nmol/kg de peso corporal de PEG₄₀-FMS-OXM resultó en la reducción de peso aparente durante 6 días. Sorprendentemente, la administración de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG₃₀-FMS-OXM resultó en una reducción elevada del peso corporal, lo que indica una eficacia mejorada en comparación con PEG₄₀-FMS-OXM (Figura 6).

OXM es un péptido potencial para el tratamiento de trastornos metabólicos tales como la diabetes y la obesidad, como se demuestra por la pérdida de peso obtenida por OXM nativa en sujetos saludables con sobrepeso y obesos (Wynne et al, 2005). Sin embargo, debido a la corta semivida del péptido y a su baja estabilidad in-vivo, se requieren administraciones diarias repetidas de dosis supra-fisiológicas para lograr un efecto farmacológico en los seres humanos. Esta patente proporciona medios efectivos para la estabilización de OXM en condiciones fisiológicas pegilando reversiblemente la OXM volviéndola de acción prolongada. Inesperadamente, la OXM modificada - la versión pegilada es activa y no es un mero pro-fármaco.

OXM pegilada de forma reversible demostró un perfil farmacocinético superior en ratas con un aumento sustancial en la exposición y semivida prolongada en comparación con OXM nativa. Al comparar el efecto de PEGs con diversos pesos moleculares conjugadas de forma reversible con OXM en el perfil OXM-PK, el conjugado PEG₄₀ demostró un efecto de prolongación superior en comparación con PEG₁₀ o PEG₂₀. Por lo tanto, el PEG₄₀ se evaluó adicionalmente en estudios farmacológicos (Figuras 1 y 2). De manera importante, la biodisponibilidad de OXM aumentó significativamente de 4,37 % a 84,6 % después de la administración SC de PEG₄₀-Fmoc-OXM, contribuyendo a la exposición incrementada de péptido pegilado reversiblemente (Tabla 2). PEG₄₀-Fmoc-OXM mejoró la tolerancia a la glucosa en comparación con la OXM nativa como se evaluó en el modelo IPGTT de ratones C57BL/6 en ayunas durante la noche. En este modelo, una OXM pegilada no reversible conjugada con PEG₄₀ (PEG₄₀-EMCS-OXM) demostró una actividad de inducción de tolerancia a la glucosa equiparable a PEG₄₀-Fmoc-OXM. Este resultado es apoyado además por la actividad in vitro observada para PEG₄₀-EMCS-OXM y PEG₄₀-Fmoc-OXM en las cuales la pegilación convencional de OXM no suprime completamente la unión de OXM a su receptor, un fenómeno observado para los péptidos pegilados debido a la interferencia estérica y, en consecuencia, no resulta en la pérdida total de actividad biológica (Figuras 3 y 4).

A continuación, el efecto de PEG₄₀-FMS-OXM en el peso corporal y la ingesta de alimentos se evaluó en ratones DIO en comparación con OXM nativa. La inyección SC de 5000 nmol/kg de OXM nativa administrada dos veces al día resultó en una reducción moderada del peso corporal y la ingesta de alimentos después de 7 días de dosificación. Por el contrario, la inyección de 5000 nmol/kg de PEG₄₀-FMS-OXM cada dos días resultó en una marcada reducción tanto del peso corporal como de la ingesta de alimentos (6 % y 24,9 % de reducción del peso corporal para OXM y PEG₄₀-FMS-OXM, respectivamente, Figura 5) en comparación con el control el Día 8. En conclusión, PEG₄₀-FMS-OXM presentó un efecto anti-obesidad prolongado y eficacia mejorada considerando que la dosis acumulativa de OXM administrada durante el estudio para PEG₄₀-FMS-OXM fue casi 4 veces menor en comparación con el grupo al que se administró OXM nativa.

OXM pegilada no reversible, PEG₄₀-EMCS-OXM, demostró que mejora la tolerancia a la glucosa en el ensayo IPGTT. Por lo tanto, fue imperativo evaluar la actividad de regulación de los alimentos de la pegilación convencional en comparación con la OXM pegilada de forma reversible y OXM nativa en el modelo DIO. La administración de 5000 nmol/kg de PEG₄₀-EMCS-OXM cada tres días resultó en una reducción despreciable del peso corporal a pesar de que la inhibición de la ingesta de alimentos fue evidente hasta 3 días después de la dosificación (Figura 6). La inhibición moderada de la ingesta de alimentos probablemente resulta de la actividad directa de OXM en el tracto gastrointestinal y se correlaciona con la actividad periférica observada en el modelo de IPGTT. Dado que la actividad de regulación de los alimentos por OXM implica el cruce de la barrera hematoencefálica y la unión a los receptores en las neuronas en el ARC (siglas inglesas de núcleo arqueado), es imperativo que la capacidad de la OXM de penetrar en el SNC no será abolida. La bioactividad periférica observada de PEG₄₀-EMCS-OXM en oposición a la falta de capacidad de este compuesto para reducir el peso corporal de ratones DIO sugiere que el enlace covalente al resto de PEG restringe la capacidad de PEG₄₀-EMCS-OXM para pasar a través la BBB (siglas inglesas de barrera hematoencefálica) en el ARC, que es el sitio de acción potencial de OXM en el hipotálamo. Por el contrario, la inyección de 5000 nmol/kg de PEG₄₀-FMS-OXM en la misma frecuencia redujo notablemente el peso corporal y la ingesta de alimentos inhibida en un 20 % como se mide el día 12. Sorprendentemente, la inyección de 8000 nmol/kg de PEG₄₀-FMS-OXM una vez a la semana resultó en una reducción del peso corporal similar en un 20 %, lo que indica que en seres humanos, la pérdida de peso significativa se puede lograr por una inyección una vez a la semana o incluso dosificación menos frecuente de OXM pegilada de forma reversible.

La estrategia de pegilación reversible es el objetivo para superar la pérdida de actividad observada a menudo en la pegilación convencional mientras se mantiene el efecto de prolongación del fármaco. En los casos en los que la bioactividad del profármaco pegilado se pierde drásticamente o incluso es abolida, la ventaja de la aplicación de pegilación reversible se probó previamente (Patente de Estados Unidos N° 7585837). Sin embargo, no se sabe cuál será la eficacia de un profármaco pegilado reversiblemente en comparación con el fármaco covalentemente pegilado de forma no reversible que conserva su actividad biológica. Esto es especialmente relevante, ya que se espera que el perfil PK del péptido pegilado de forma covalente sea superior en comparación con el péptido pegilado reversible cuando se evalúan las concentraciones en sangre de conjugado, debido a la lenta liberación del péptido del conjugado. PEG₄₀-EMCS-OXM demostró que es activa tanto in-vitro como en el modelo de IPGTT in-vivo. Por lo tanto, era posible que esta molécula también indujera la saciedad y redujera el peso corporal después de la administración SC a ratones. Sin embargo, esto ha demostrado ser incorrecto, ya que PEG₄₀-EMCS-OXM fracasa en reducir el peso corporal en ratones DIO, mientras que PEG₄₀-FMS-OXM tuvo un efecto marcado. La publicación previa presentó datos contradictorios referentes a la contribución de la actividad periférica de OXM y la actividad en el SNC de OXM. Por una parte, las acciones anoréxicas de la OXM ip fueron bloqueadas por la administración previa intra-ARC de GLP-1R, indicando exendin₂₉₋₃₉ la importancia de la actividad relacionada con el SNC de OXM (Dakin et al 2004). Sin embargo, un suministro oral de Bifidobacterium que expresa OXM a ratones con sobrepeso resultó en la reducción del peso corporal, mientras que la OXM no se detectó en el plasma de estos ratones, lo que sugiere que la activación directa de las células gastrointestinales es importante para la actividad de la pérdida de peso de OXM (Long et al, 2010). Como se mencionó anteriormente, la falta de información sobre el modo de acción

de OXM y el impacto de la pegilación, fue imposible predecir cuál será la eficacia de OXM pegilada de forma reversible en comparación con OXM nativa y OXM pegilada de forma covalente unida.

- La eficacia superior de PEG₃₀-FMS-OXM en comparación con PEG₄₀-FMS-OXM como se muestra en el estudio 2 fue sorprendente. Aunque no se evaluó el perfil de PK de PEG₃₀-FMS-OXM, el perfil de PK PEG₄₀-FMS-OXM fue claramente superior a PEG₁₀-FMS-OXM y PEG₂₀-FMS-OXM. Es posible que el uso de PEG₃₀ presente el tamaño de PEG favorable que, por una parte, reduce de manera significativa el aclaramiento renal del conjugado PEG₃₀-FMS-OXM, mientras que facilita la velocidad de hidrólisis de OXM del conjugado que permite una presencia sostenida de OXM requerida para la obtención de sus actividades farmacológicas.

Estudio 3

- En este estudio se evaluó la conjugación de OXM con PEG de diversos tamaños. Como se demostró en los estudios previos, la administración de PEG₃₀-FMS-OXM y PEG₄₀-FMS-OXM una vez a la semana tuvo un marcado efecto sobre el peso corporal. Sorprendentemente, PEG₅-FMS-OXM perdió completamente la capacidad de inducir la pérdida de peso en comparación con el grupo de vehículo, mientras que PEG₆₀-FMS-OXM indujo una reducción aún más pronunciada que PEG₃₀-FMS-OXM. La diferencia en la pérdida de peso entre PEG₃₀-FMS-OXM y PEG₄₀-FMS-OXM en este estudio estuvo en el intervalo de variabilidad del experimento y no fue significativa.

EJEMPLO 6

Perfiles Glucémicos y Lipidémicos Mejorados en Ratones Obesos Tratados con OXM PEGilada Reversible

20 Materiales y Métodos

Procedimientos Experimentales para el Modelo de Ratón con Obesidad Inducida por la Dieta (DIO):

- El modelo de DIO se realizó en RenaSci Ltd (Nottingham, Reino Unido). Ratones C57BL/6J (4-6 semanas de edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido), fueron expuestos a una dieta alta en grasas (D12451; 45 % de kcal derivadas de la grasa; Research Diets, New Jersey, EE.UU.) durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal promedio es aproximadamente 50 g). Dos semanas antes de la administración del fármaco, los animales fueron alojados individualmente y se colocaron en iluminación de fase inversa (luces apagadas durante 8 h desde 09:30-17:30 h). Durante la primera semana de alojamiento individual (período de referencia), los animales comenzaron un protocolo de manipulación una vez al día y durante la segunda semana (período de referencia), fueron dosificados con el vehículo apropiado b.i.d. o una vez a la semana, ya que fueron dosificados durante el período de tratamiento) por una vía subcutánea. 7 grupos (n = 8) de ratones DIO fueron dosificados durante 29 días de la siguiente manera:

Grupo	Tratamiento (sc)	Frecuencia
A	PEG40-SH (662 mg/kg)	Una vez a la semana (1, 8, 15, 22, 29)
B	PEG40-EMCS-OXM (6.000 mmol/kg)	Una vez a la semana (1, 8, 15, 22, 29)
C	PEG30-EMCS-OXM (6.000 mmol/kg)	Una vez a la semana (1, 8, 15, 22, 29)
D	PEG40-FMS-OXM (6.000 mmol/kg)	Una vez a la semana (1, 8, 15, 22, 29)
E	PEG30-FMS-OXM (6.000 mmol/kg)	Una vez a la semana (1, 8, 15, 22, 29)
F	Vehículo (PBS)	b.i.d
G	OXM (6.000 mmol/kg; PBS)	b.i.d

- Durante el período de referencia y el de tratamiento, la ingesta de alimentos, la ingesta de agua y el peso corporal se registraron diariamente. Los días 1 y 22 después de una referencia de dos semanas, todos los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche. Los días 2 y 23, los ratones se sometieron a un ensayo oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). A cada uno de los animales se le dosificó vehículo o compuesto de ensayo y 60 minutos más tarde se les dosificó D-glucosa (2 g/kg p.o.). Las muestras de sangre de referencia fueron tomadas inmediatamente antes de la dosificación con vehículo o compuesto de ensayo (B1) e inmediatamente antes de la carga de glucosa (B2). Muestras de sangre adicionales se tomaron 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa. Todas las muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y se sometieron a ensayo en cuanto a la glucosa (n = 2) y la insulina (n = 1) utilizando el reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y ELISA de insulina de ratón ultrasensible Alpco (80-INSMSU-E10), respectivamente. El Día 30 se

recogieron muestras de plasma terminales (24 horas después de la dosis final el Día 29) por punción cardíaca y se sometieron a ensayo en cuanto a la insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos utilizando ELISA de insulina de ratón ultrasensible (80-INSMSU-E10), reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421), reactivo de colesterol Thermoelectron Infinity (TR13421) y el kit de Sigma Triglyceride (TR0100). Los pesos finales de las

5

Procedimientos experimentales para los estudios de composición corporal:

Los niveles de grasa corporal, proteínas, agua y cenizas de los cadáveres se determinaron utilizando técnicas de análisis químico estándares. Solo se midió el contenido de grasa, proteína, agua y cenizas, puesto que otros componentes (principalmente carbohidratos) forman menos de 2 % de la composición total del cuerpo. El agua del cadáver se determinó por liofilización de los cadáveres de ratón a peso constante. Los cadáveres secos se molieron luego en una trituradora de laboratorio listos para análisis posteriores. La grasa del cadáver se determinó en las muestras liofilizadas utilizando un protocolo de extracción de Soxhlet modificado (éter de petróleo a 40-60 °C) con un sistema Tecator Soxtec 2050 (Foss UK Ltd, Wheldrake, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las proteínas del cadáver se determinaron utilizando un

10

15

Datos y análisis estadísticos:

Los pesos corporales, la ingesta de alimentos y la ingesta de agua se expresan como valores medios \pm EMT. Los datos del peso corporal, ganancia de peso corporal, ingesta de alimentos diaria y promedio e ingesta de agua e ingesta de alimentos acumulada se analizaron por ANCOVA con referencia como una covariable, seguido de comparaciones apropiadas (dos colas) para determinar las diferencias significativas del grupo control. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. El valor de referencia fue el valor del Día 1 para el peso corporal o el consumo promedio de alimento o agua durante el período de referencia.

20

La insulina, colesterol y triglicéridos en plasma terminal se analizaron por modelo lineal general con el tratamiento como un factor y el orden de sangrado y el peso corporal de valor basal como covariables seguido de comparaciones apropiadas (dos colas) para determinar las diferencias significativas del grupo de vehículo relevante. Si es apropiado se utilizaron técnicas de regresión robusta y/o transformación logarítmica.

25

Los datos para cada uno de los parámetros de composición corporal (grasa, proteínas, agua y cenizas) se presentaron como g/cadáver y % total. Los pesos finales de los cadáveres también se analizaron como una comparación directa. El análisis se hizo mediante regresión robusta con el tratamiento como un factor y el peso corporal en la referencia como una covariable, seguido de ensayos apropiados de comparaciones múltiples (dos colas) para comparar los efectos de cada uno de los grupos de tratamiento con el grupo de vehículo relevante.

30

Resultados

35

Una inyección semanal de PEG30 reversible (PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg; tampón citrato)) o PEG40 reversible (PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg; tampón citrato)), durante un período de 30 días, proporcionó 28 % y 23 % de pérdida de peso, respectivamente, en comparación con 17 % de pérdida de peso para el grupo al que se inyectó dos veces al día oxintomodulina nativa (Figura 7) - mientras que la dosificación acumulativa de la oxintomodulina neta inyectada con PEG30 reversible fue solo 8,6 % para el período de 30 días. Las OXM PEGiladas de forma no reversible (PEG40-EMCS-OXM y PEG30-EMCS-OXM) fueron aún menos efectivas en la reducción del peso corporal.

40

La tolerancia a la glucosa en ratones DIO después de las inyecciones semanales con OXM PEGilada reversible (PEG30-FMS-OXM o PEG40-FMS-OXM) fue equiparable con la tolerancia a la glucosa provocada por una inyección dos veces al día de oxintomodulina nativa el Día 2 (Figura 8A) y el Día 23 (Figura 8B).

45

Además, una administración una vez a la semana de OXM PEGilada reversible mejoró los perfiles glucémico y lipídico en ratones DIO, demostrado por una reducción en la glucosa terminal (Figura 9A), una reducción en la insulina terminal (Figura 9B), una reducción en el colesterol terminal (Figura 9C) y una reducción en el glicerol terminal (Figura 9D).

Finalmente, un análisis de la composición corporal de los ratones DIO demostró que la pérdida de peso demostrada por los ratones tratados con OXM PEGilada reversible resultó de una reducción específica de la grasa (Figura 10).

50

En conjunto, la PEGilación inversa demostró que es segura y tolerable en diferentes modelos toxicológicos de animales roedores. La PEGilación inversa también permite el alargamiento de la semivida de OXM, al tiempo que mantiene su potencial para penetrar en los tejidos objetivo (p. ej., penetrar la BBB).

55

La OXM pegilada de forma reversible demostró propiedades superiores de acción prolongada, soportando la inyección una vez a la semana en los seres humanos. La OXM PEGilada de forma reversible redujo el peso corporal por una reducción específica en grasas (evaluación de Composición Corporal). La OXM PEGilada de forma reversible mejoró los perfiles glucémicos y lipídicos. Se espera que la OXM PEGilada de forma reversible proporcione terapia de largo plazo para pacientes con obesidad y diabetes Tipo II a través de sus impresionantes efectos sobre la actividad de la glucemia y la pérdida de grasa.

EJEMPLO 7

Efecto de OXM pegilada reversible en el nivel de la glucosa y la secreción de insulina

Procedimientos experimentales para el modelo de ratón de Obesidad Inducida por la Dieta (DIO):

El modelo de DIO se realizó en RenaSci Ltd (Nottingham, Reino Unido). Ratones 57BL/6J (4-6 semanas de edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido) se expusieron a una dieta alta en grasas (12451 D; 45 % de kcal derivadas de la grasa; Research Diets, New Jersey, EE.UU.) durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal promedio fue aproximadamente 50 g). Dos semanas antes de la administración del fármaco, los animales fueron alojados individualmente, comenzando un período de aclimatación. En la primera semana, el período de manipulación, los animales comenzaron un protocolo de manipulación una vez al día y durante la segunda semana, el período de referencia, fueron dosificados con el vehículo apropiado; (b.i.d. o una vez a la semana cuando fueron dosificados durante el periodo de tratamiento) por una vía subcutánea. Durante el período de referencia y el de tratamiento, la ingesta de alimentos, ingesta de agua y el peso corporal se registraron diariamente. En la mañana del día 1, los ratones fueron dosificados seguido de un ayuno durante la noche. El día 2, 24 h después de la siguiente administración (grupos A-E) o antes de la dosis de la mañana (grupos F-H), los ratones fueron muestreados en cuanto a la glucosa en ayunas e insulina en ayunas. Todas las muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y se sometieron a ensayo en cuanto a la glucosa (n = 2) y la insulina (n = 1) utilizando el reactivo de glucosa ThermoFisher Infinity (TR15421) y ELISA de insulina de ratón ultrasensible Alpco (80-INSMSU-E10), respectivamente.

Resultados

En este conjunto de experimentos se realizaron dos estudios *in vivo* independientes. El primer experimento incluyó 8 grupos (n = 8) de ratones DIO que fueron dosificados durante 2 días de la siguiente manera:

Grupo	Tratamiento (sc)	Frecuencia
A	PEG40-SH (662 mg/kg)	Inyección única el día 1
B	PEG40-EMCS-OXM (6.000 mmol/kg)	Inyección única el día 1
C	PEG30-EMCS-OXM (6.000 mmol/kg)	Inyección única el día 1
D	PEG40-FMS-OXM (6.000 mmol/kg)	Inyección única el día 1
E	PEG30-FMS-OXM (6.000 mmol/kg)	Inyección única el día 1
F	Vehículo (PBS)	b.i.d
G	OXM (6.000 mmol/kg; PBS)	b.i.d
H	Liraglutida (200 µg/kg)	b.i.d

El segundo experimento incluyó 7 grupos (n = 7) de ratones DIO que fueron dosificados durante 2 días de la siguiente manera:

Grupo	Tratamiento (sc)	Frecuencia
A	PEG60-SH (947,4 mg/kg)	Inyección única el día 1
B	PEG5-FMS-OXM 6000 mmol/kg	Inyección única el día 1
C	PEG30-FMS-6000 mmol/kg	Inyección única el día 1
D	PEG40-FMS-OXM 6000 mmol/kg	Inyección única el día 1

E	PEG60-FMS-OXM 6000 mmol/kg	Inyección única el día 1
F	Vehículo (PBS)	b.i.d
G	Liraglutida (200 µg/kg bid) en PBS	b.i.d

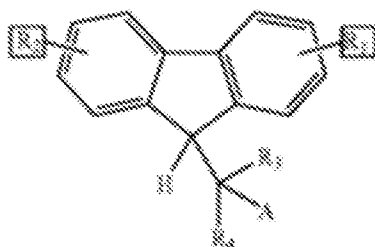
En ambos estudios la administración de una dosis única de todas las variantes de PEG-OXM: PEG40-EMCS-OXM, PEG30-EMCS-OXM, PEG40-FMS-OXM, PEG30-FMS-OXM (Exp. nº 1) o PEG30-FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG60-FMS-OXM (Exp. nº 2) produjo reducciones marcadas y significativas en la glucosa en ayunas en comparación con el vehículo (Figuras 11 y 12). En el experimento nº 1 el grupo de vehículo (PEG40-SH) presenta un nivel de glucosa de 9,5 mM, mientras que los grupos tratados con PEG-OXM presentan un nivel de glucosa de 5,18 a 5,8 mM. Se obtuvo la misma reducción del nivel de glucosa también para el grupo tratado con PEG-OXM en el Experimento nº 2 (excepto el grupo de PEG5-OXM) que mostró reducción de glucosa desde 11,9 mM del grupo de vehículo a 5-5,7 mM del grupo tratado con PEG-OXM. Este efecto estuvo asociado con una reducción de los niveles de insulina en plasma en ayunas en el experimento nº 1 desde 2,8 ng/ml del grupo de vehículo a 1,4-1,9 ng/ml de los grupos tratados con PEG-OXM, como se muestra en la Figura 11. En el Experimento nº 2 el nivel de insulina en ayunas fue 0,99 ng/ml, mientras que el nivel de insulina en ayunas de PEG-OXM (excepto PEG5-OXM) fue 0,78 a 0,91 ng/ml.

Liraglutida en ambos experimentos redujo significativamente la glucosa en ayunas en comparación con el vehículo (PBS); 9,3 mM de vehículo disminuyó a 6,06 mM en el experimento nº 1 y 11,5 mM de vehículo disminuyó a 6,7 mM en el experimento nº 2. Junto con esta reducción de glucosa, este grupo tratado presentó un aumento significativo en la insulina en plasma desde 2,5 ng/ml de vehículo a 4,4 ng/ml en el experimento nº 1 y desde 1,98 ng/ml a 3 ng/ml en el experimento nº 2. El péptido OXM nativo se analizó en el experimento nº 1 y no mostró diferencia significativa alguna en los niveles de glucosa e insulina en comparación con el vehículo, probablemente debido a su corta semivida en suero y aclaramiento muy rápido del cuerpo.

Los resultados de estos dos experimentos independientes en ratones DIO revelan que los compuestos PEG-OXM inducen una reducción significativa del nivel de glucosa pero sin aumentar el nivel de insulina como se observó después de la administración de Liraglutida, y como se esperaba a partir de los datos anteriormente que se han mostrado para el péptido OXM nativo. Esta reducción inesperada del nivel de glucosa junto con la reducción de los niveles de insulina en ayunas indica que una dosis única de PEG-OXM conducen al aumento de la sensibilidad de los animales a la insulina ya después de la exposición aguda y no debido al tratamiento crónico.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula $(X)_n-Y$, en donde Y es un agonista dual del receptor de GLP-1/Glucagón que consiste en un péptido de oxintomodulina (OXM) que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 y que porta un grupo amino o hidroxilo libre, y en donde X es un radical de fórmula (i)



5

en donde

R₁ es un resto polietilenglicol (PEG);

R₂ es hidrógeno o es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno;

R₃ y R₄ son cada uno hidrógeno;

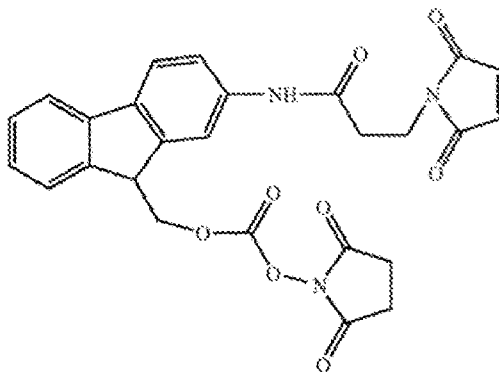
10 A es -OCO-, en donde el radical de fórmula (i) está enlazado a un grupo amino o hidroxilo del fármaco Y; y
n es un número entero de al menos uno.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el resto PEG es un PEG lineal.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el resto PEG es un PEG ramificado.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el resto PEG es un PEG de 30 kDa, 40 kDa o 60 kDa.

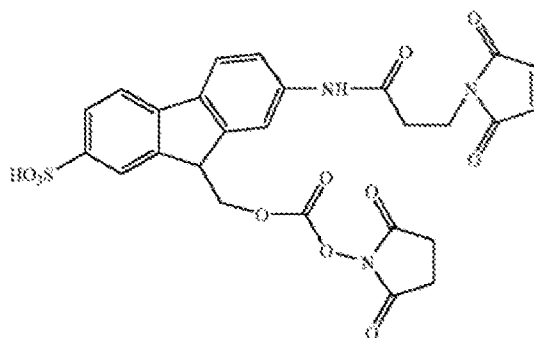
15 5. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se prepara a partir de un MAL-Fmoc-NHS que tiene la fórmula:



Precursor 7

en donde dicho compuesto se designa como (PEG-Fmoc-)n-OXM.

20 6. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se prepara a partir de un MAL-FMS-NHS que tiene la fórmula:



Precursor 8

, en donde dicho compuesto se designa como (PEG-FMS-)n-OXM.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde Y está enlazado al radical Fmoc a través de un grupo amino.
- 5 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde Y está enlazado al radical FMS a través de un grupo amino.
9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho grupo amino es el extremo amino de dicha oxintomodulina.
- 10 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el PEG está enlazado al radical FMS o Fmoc a través de un grupo sulfhidrilo.
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
12. Un método para la preparación de oxintomodulina que tiene una semivida biológica extendida, que consiste en la etapa de conjugar oxintomodulina, un polímero de polietilenglicol (polímero PEG) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:1:0,5 a 15 1:1:3,5 para formar un compuesto de la reivindicación 1.
13. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso en inducir la tolerancia a la glucosa y/o en mejorar el control glicémico, o para uso en reducir la ingesta de alimentos y/o reducir el peso corporal en un sujeto que lo necesite.
- 20 14. El compuesto de la reivindicación 1, para uso en tratar la diabetes mellitus, diabetes mellitus asociada con la obesidad, obesidad, un trastorno de la alimentación o un trastorno metabólico en un sujeto.
15. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso como un medicamento.
- 25 16. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R₂ es -SO₃H en la posición 2 del anillo de fluoreno, y el resto PEG es un PEG de 40 kDa.

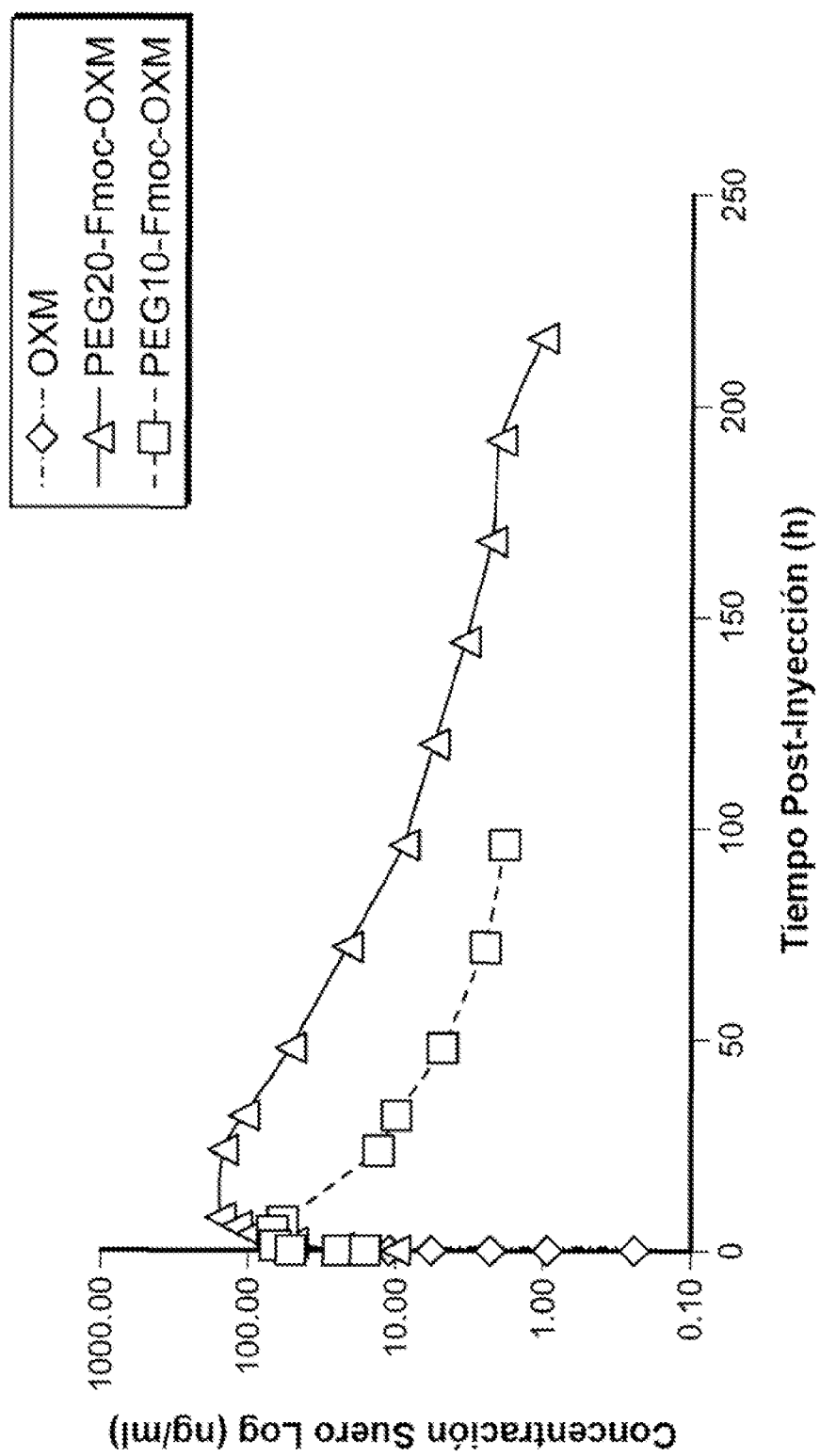


FIG. 1

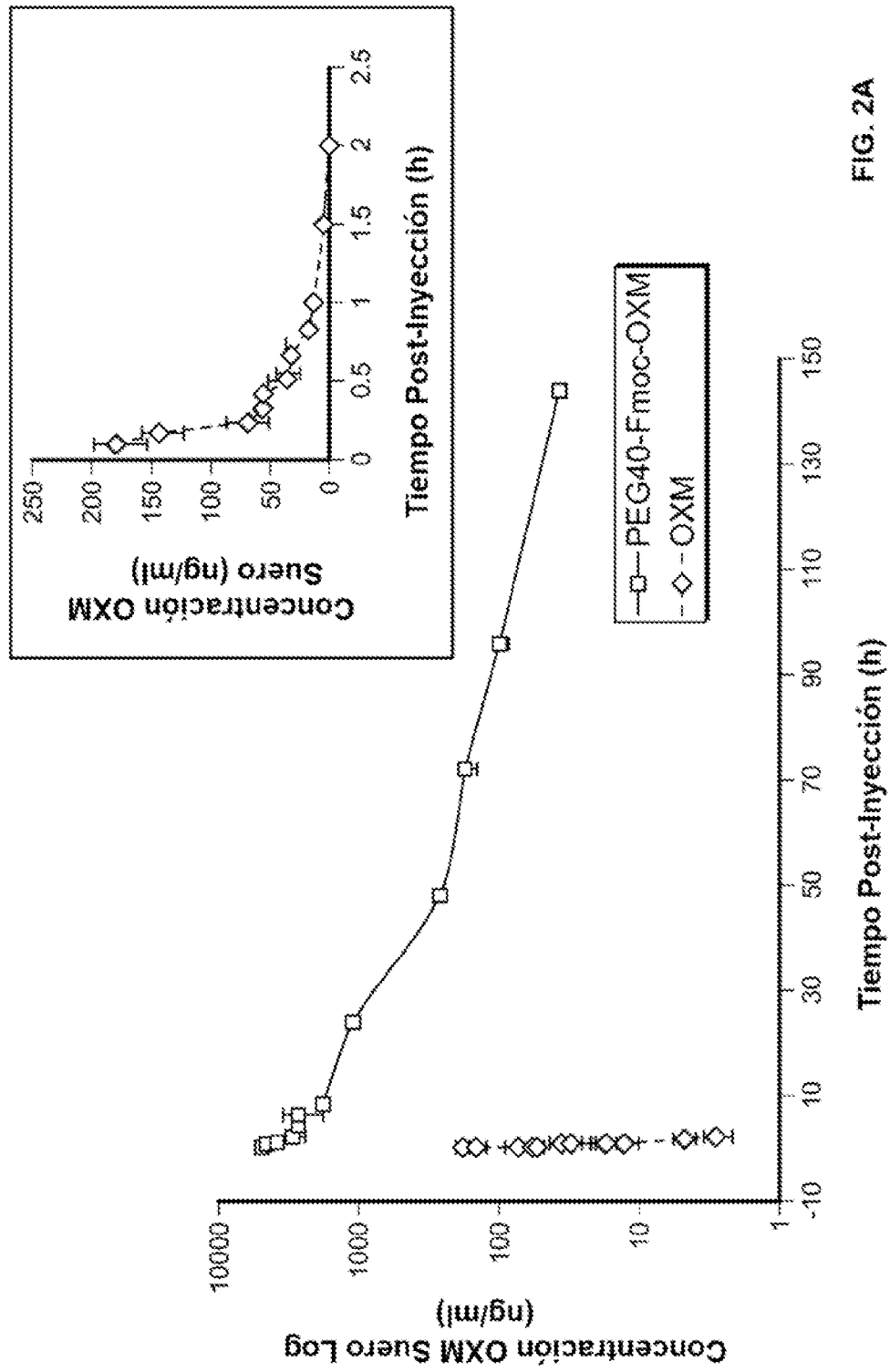


FIG. 2A

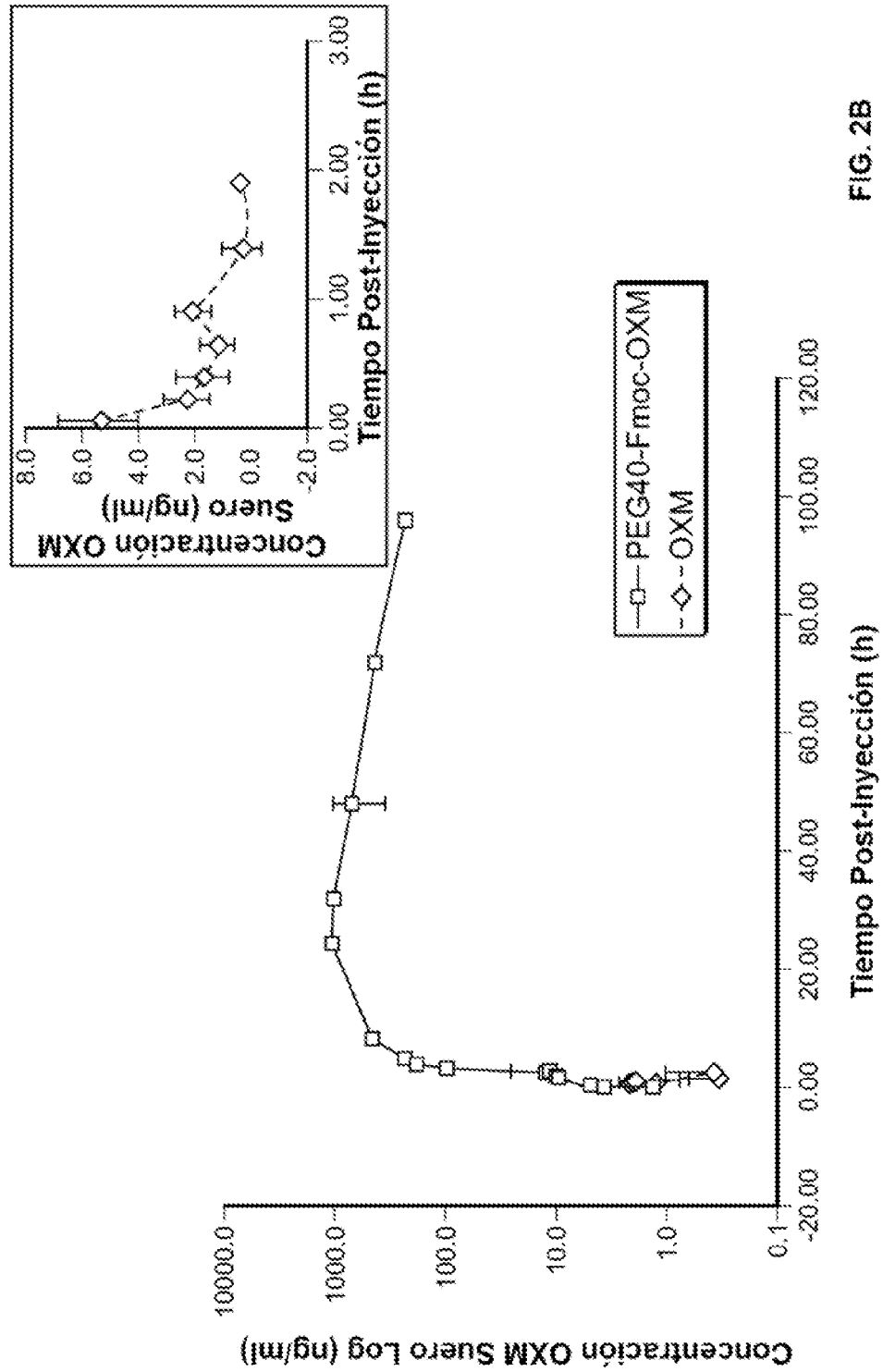


FIG. 2B

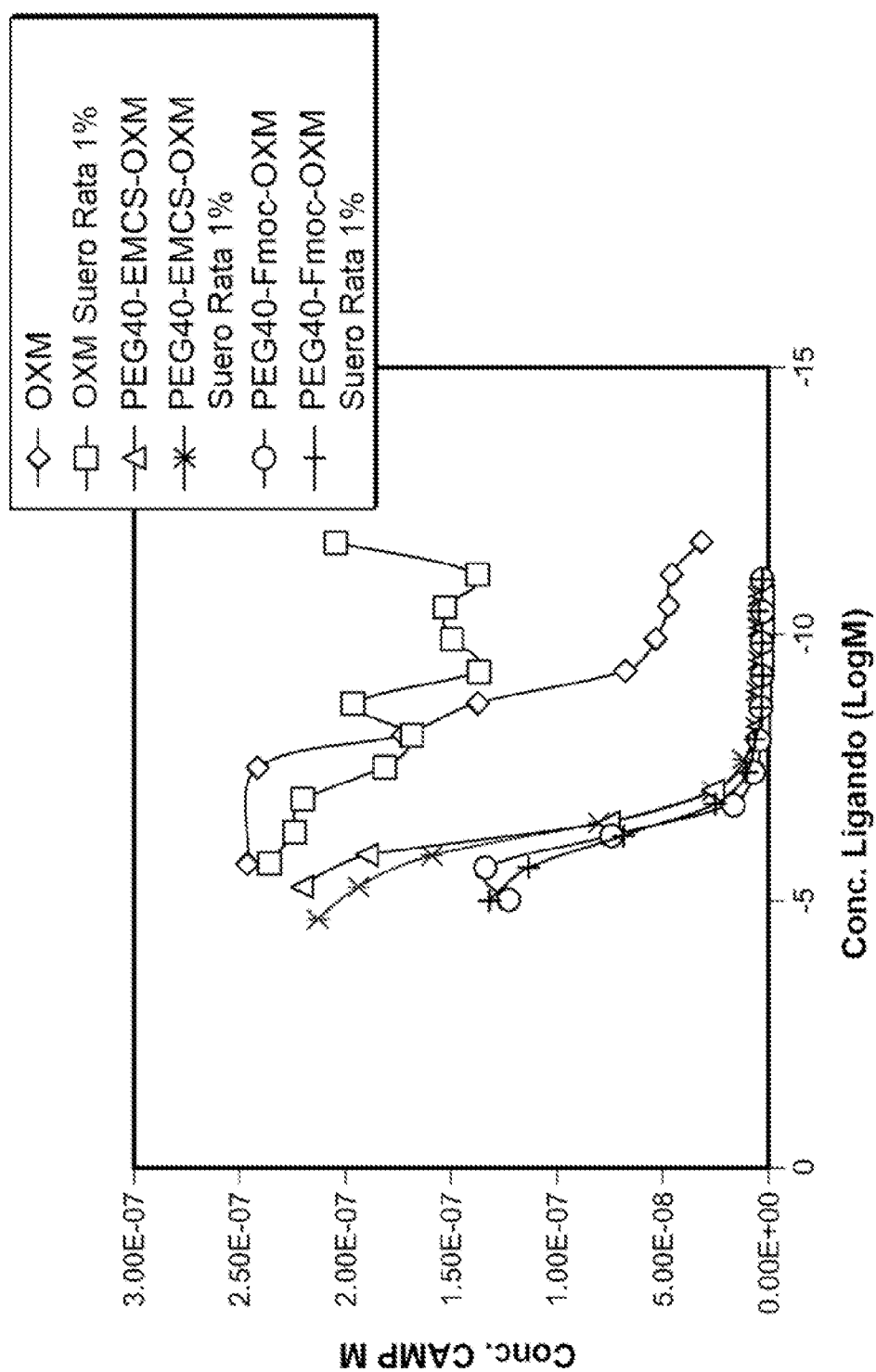


FIG. 3

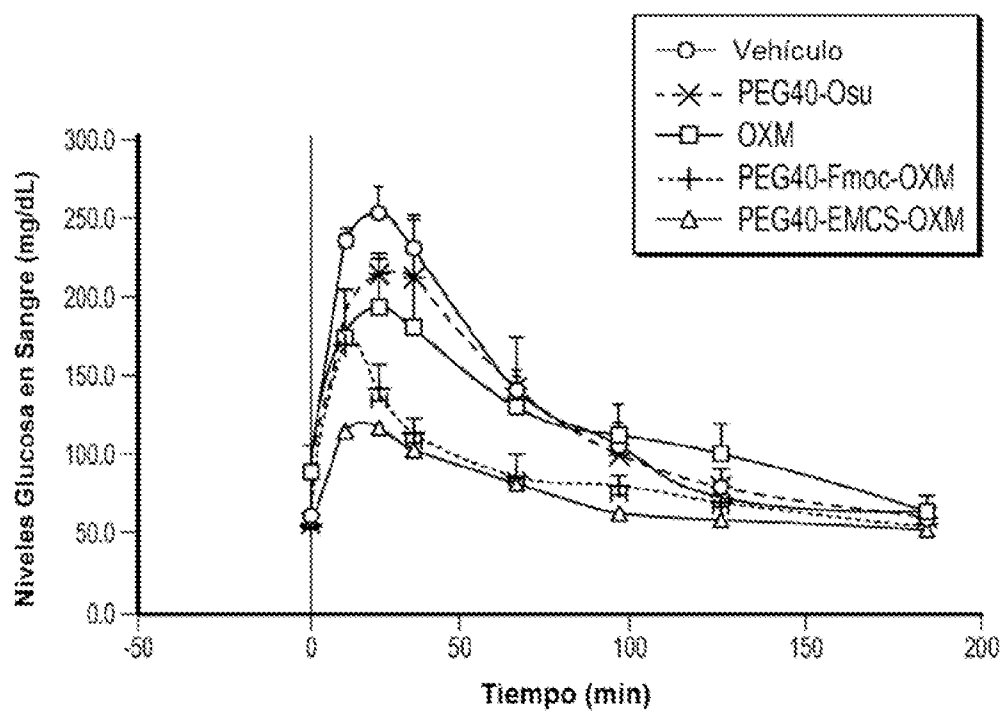


FIG. 4A

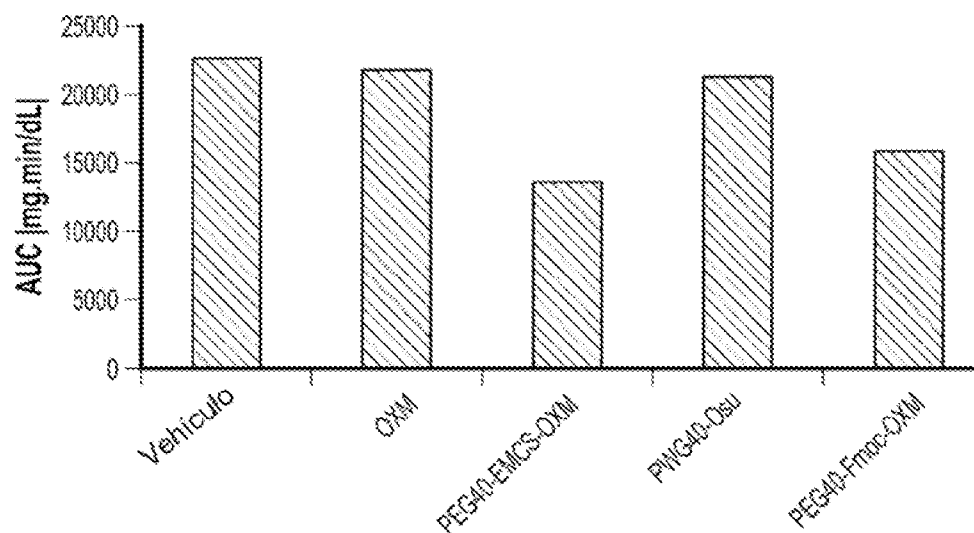


FIG. 4B

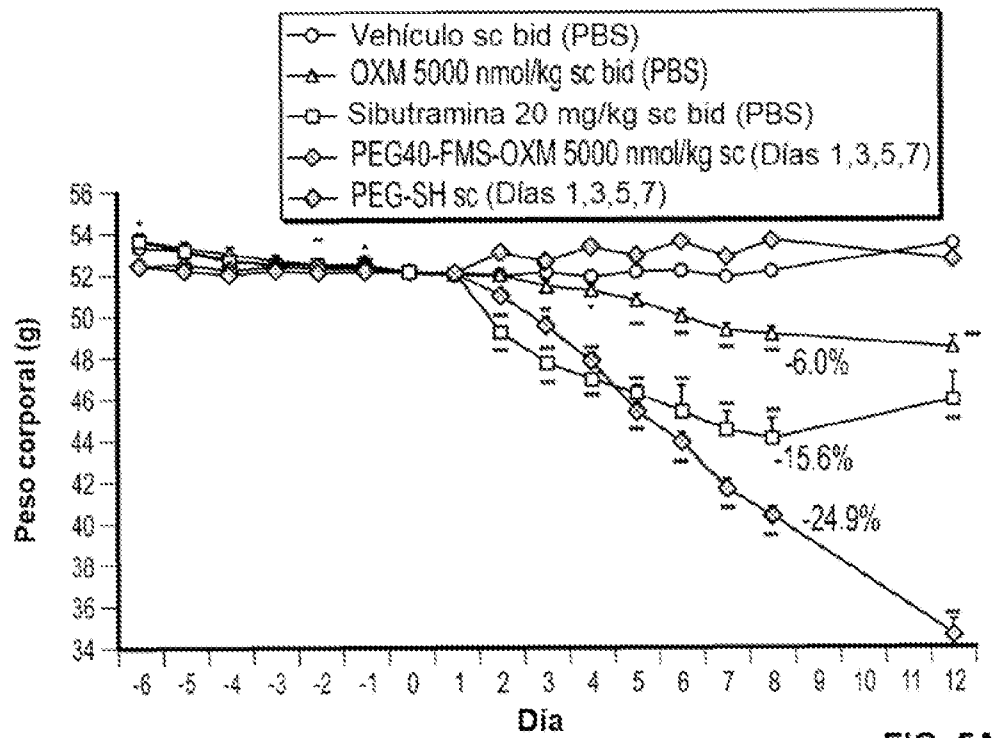


FIG. 5A

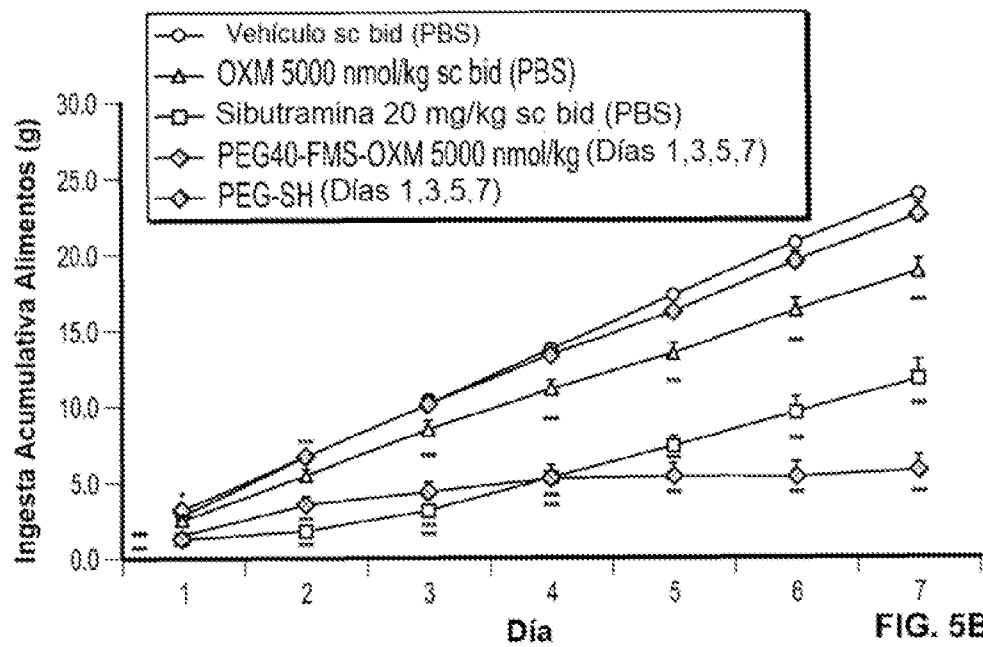


FIG. 5B

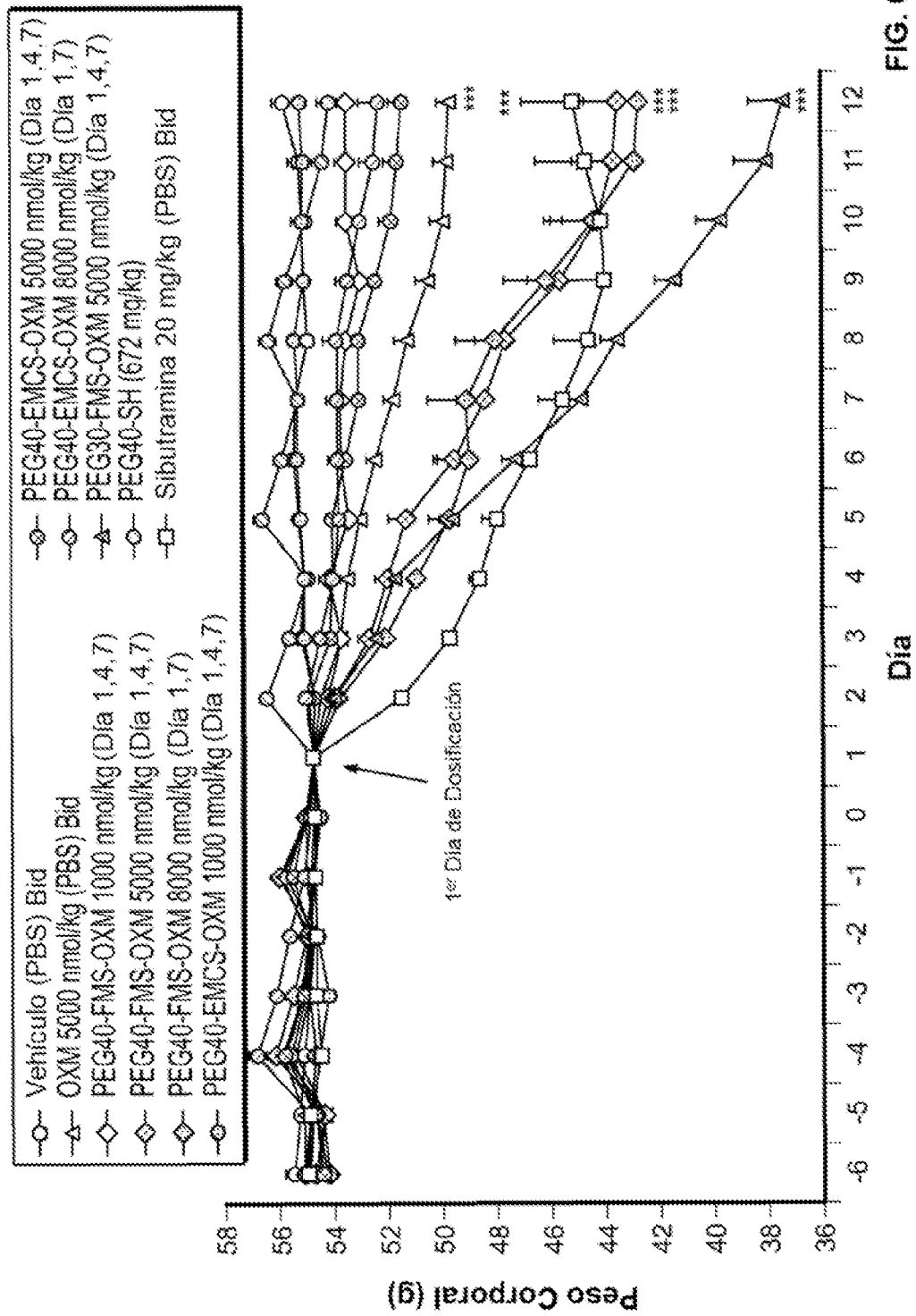


FIG. 6A

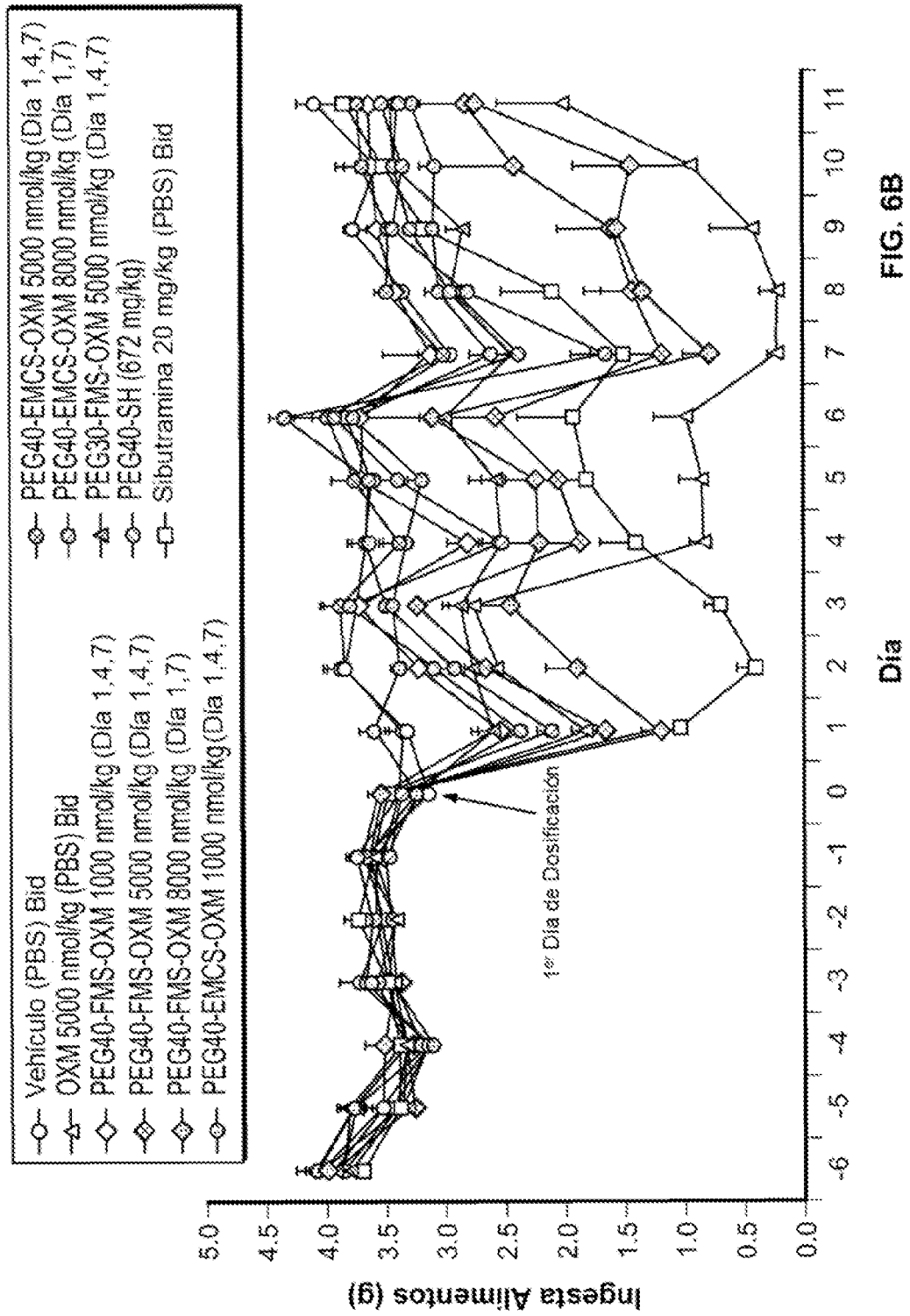
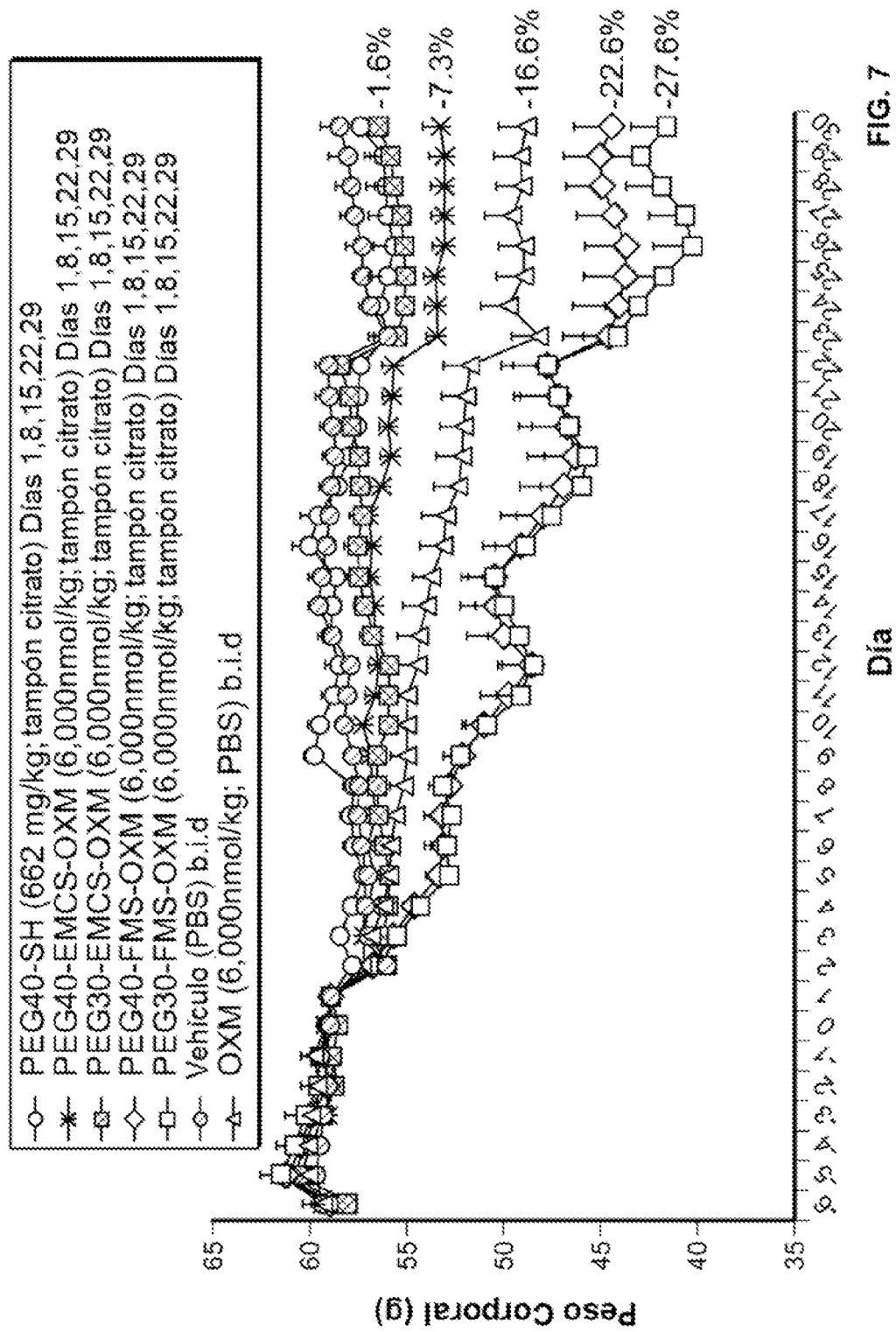
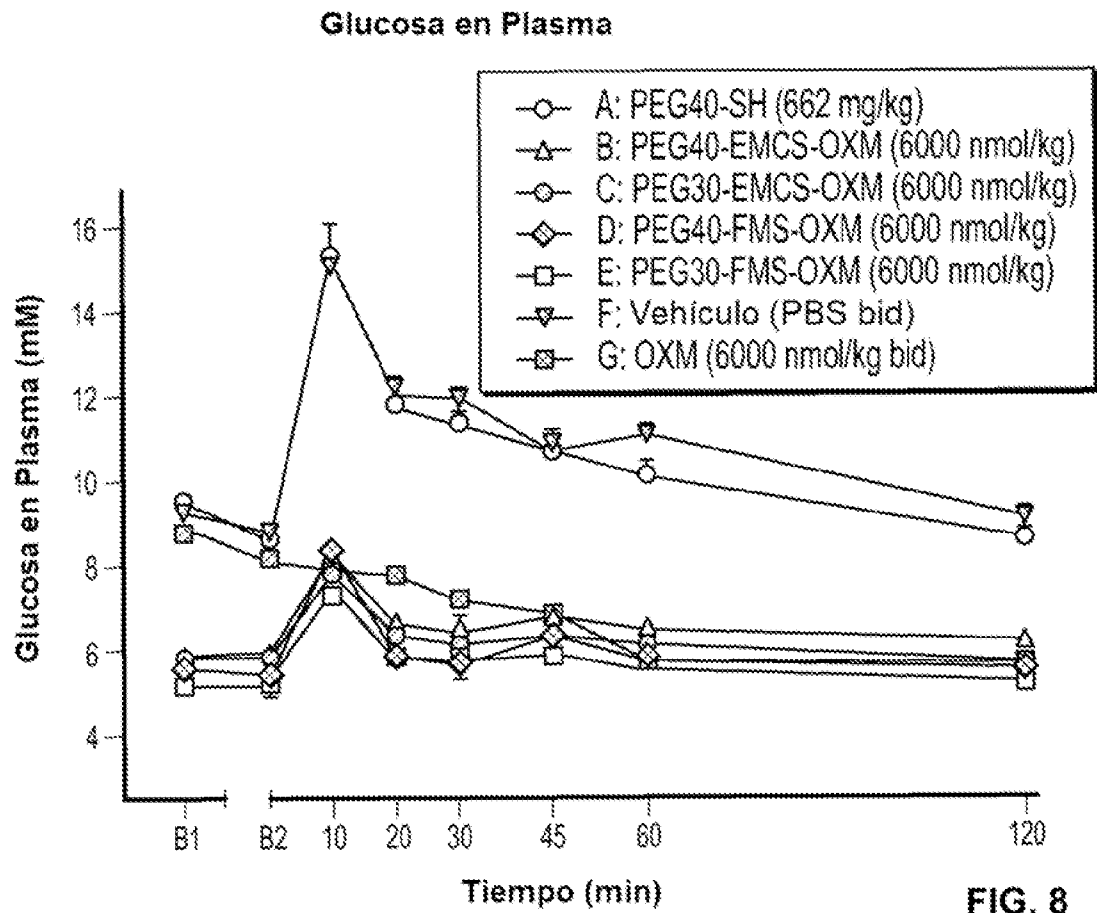
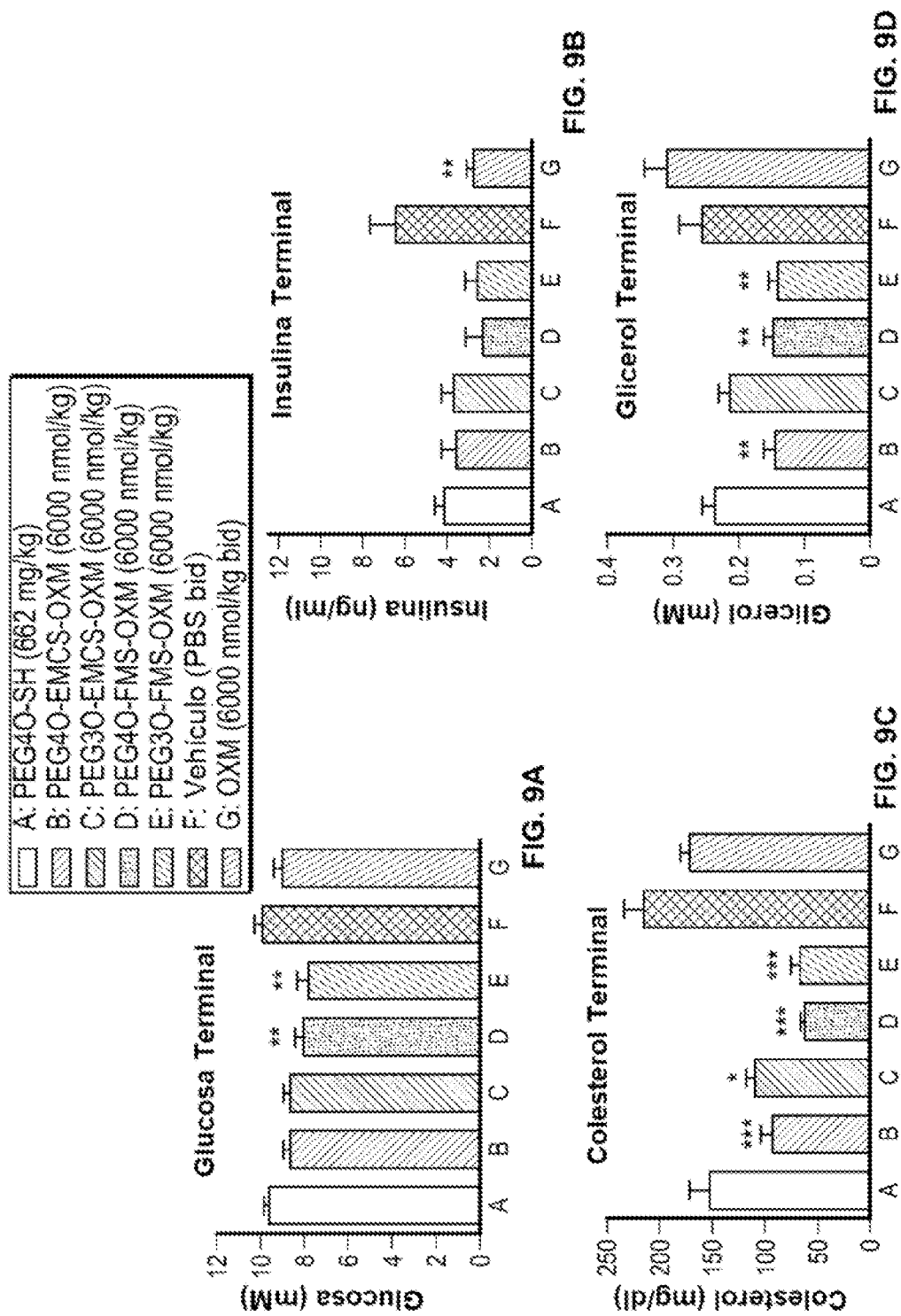


FIG. 6B



**FIG. 8**



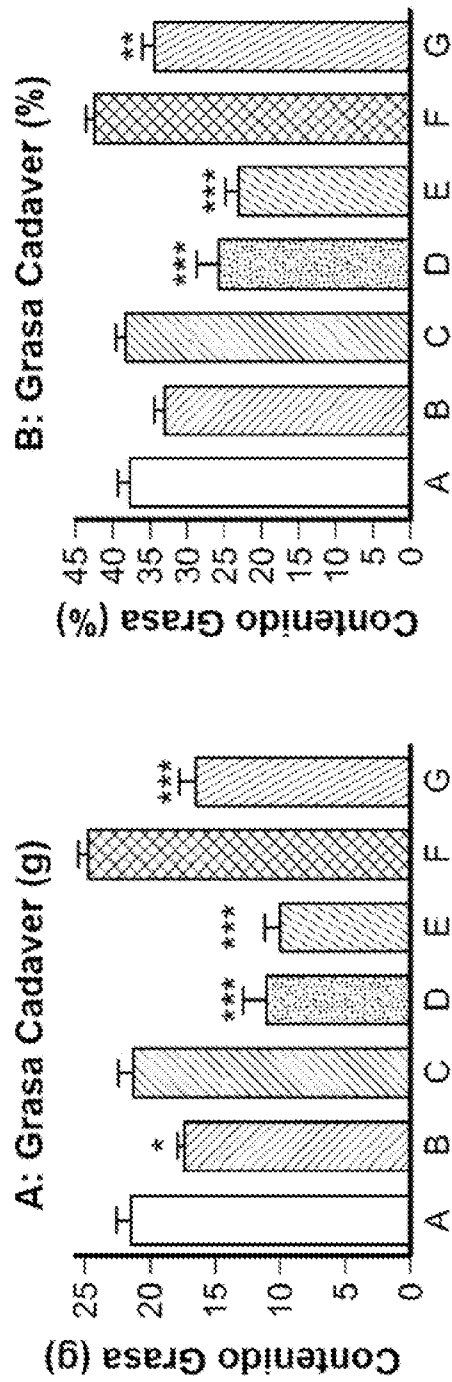


FIG. 10A

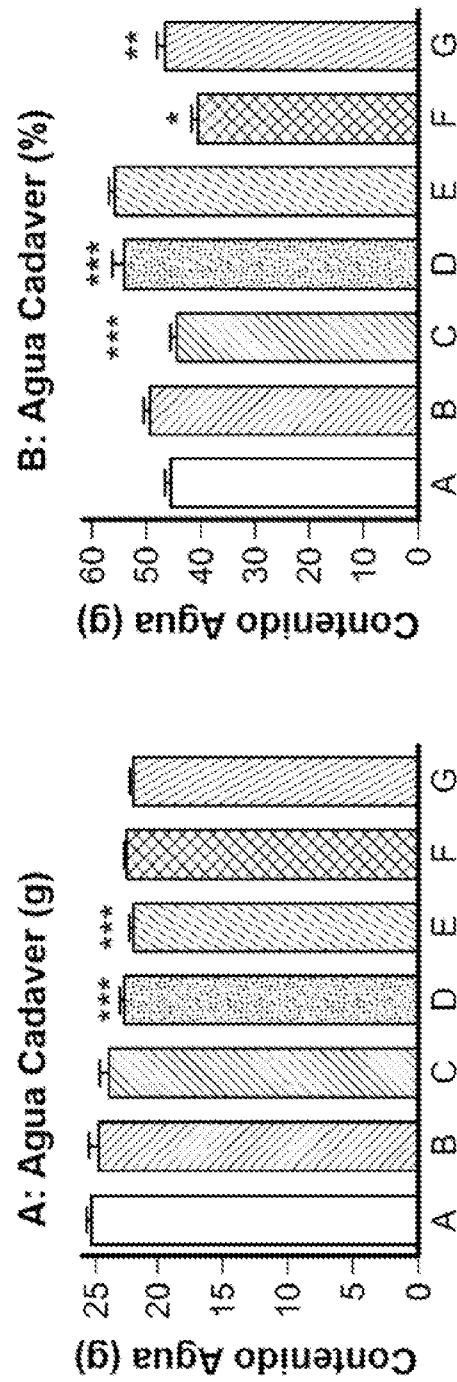


FIG. 10B

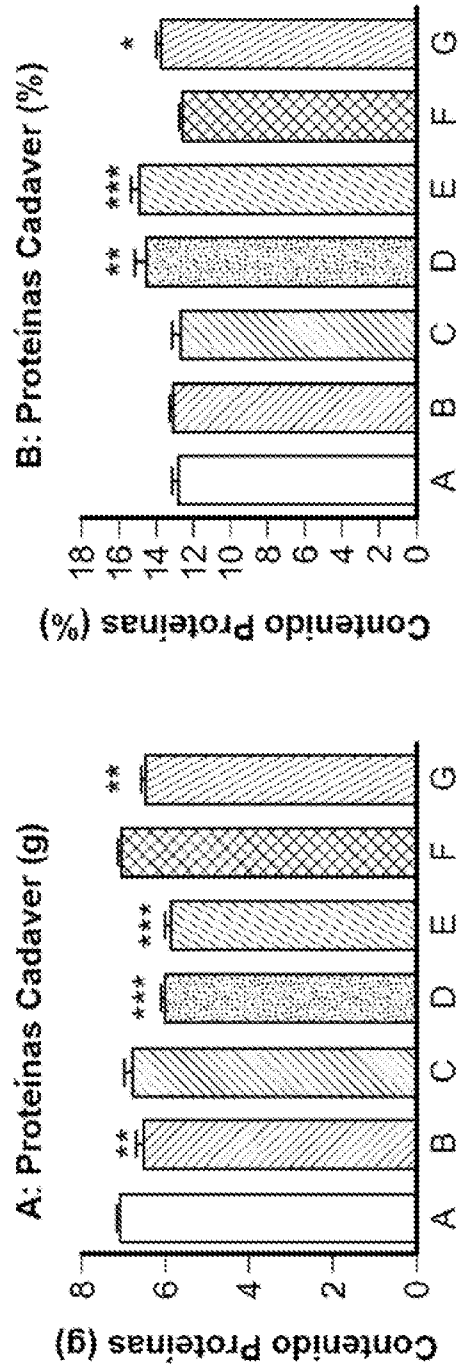


FIG. 10C

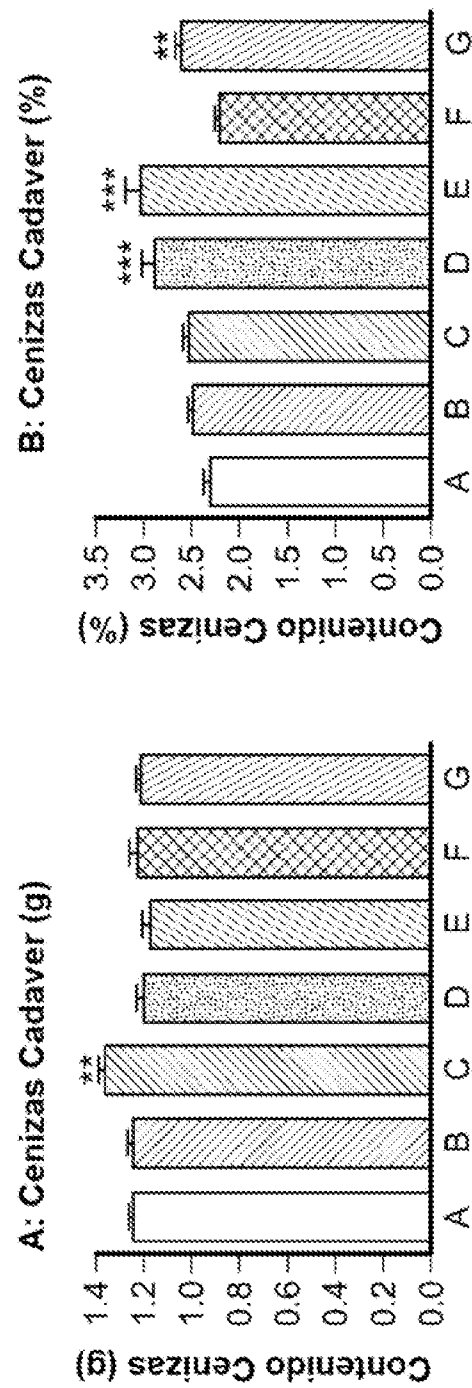


FIG. 10D

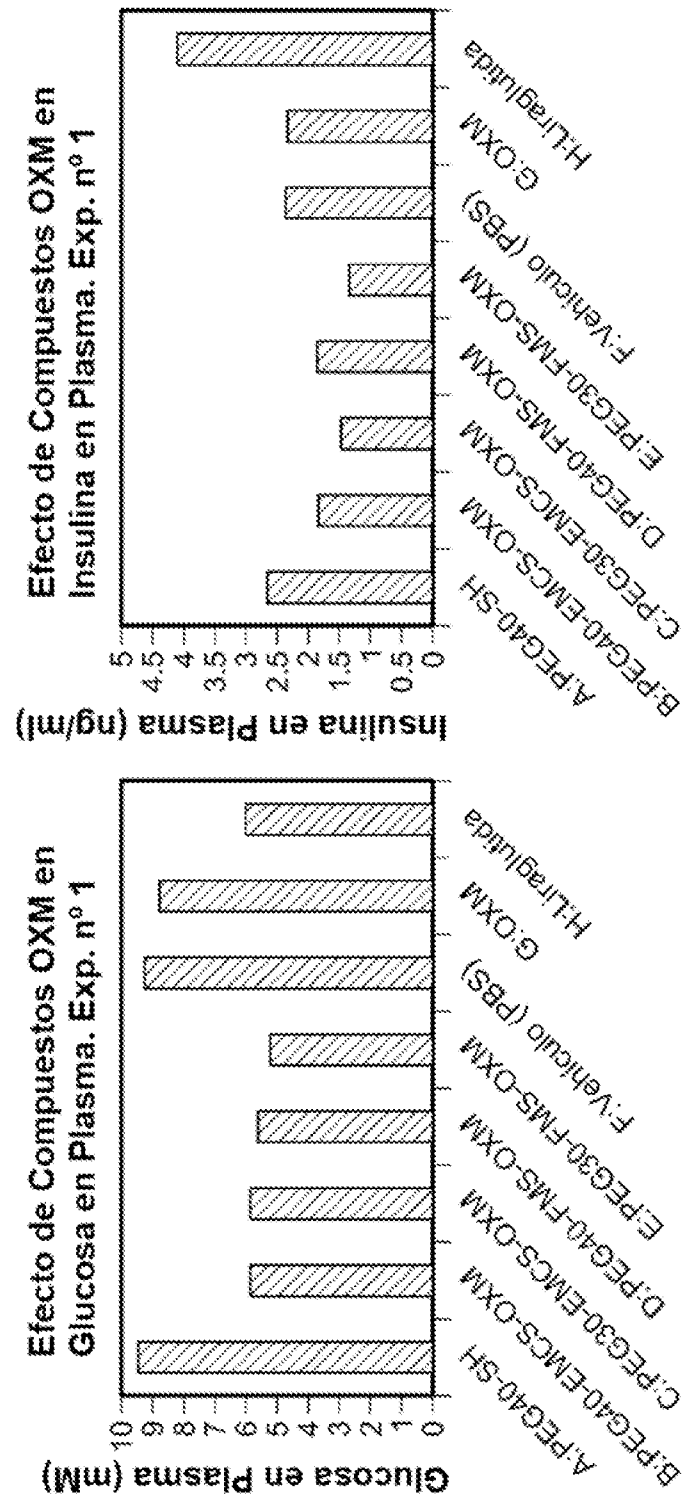


FIG. 11

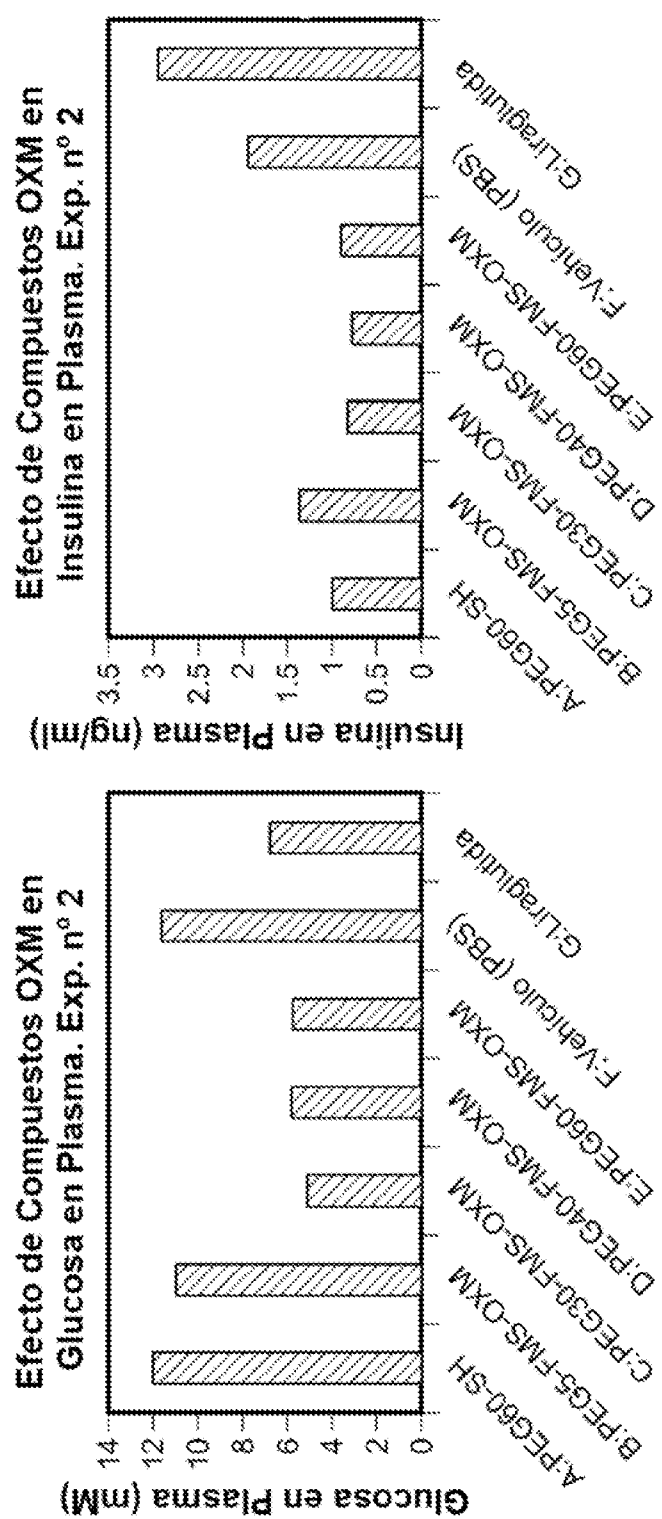


FIG. 12

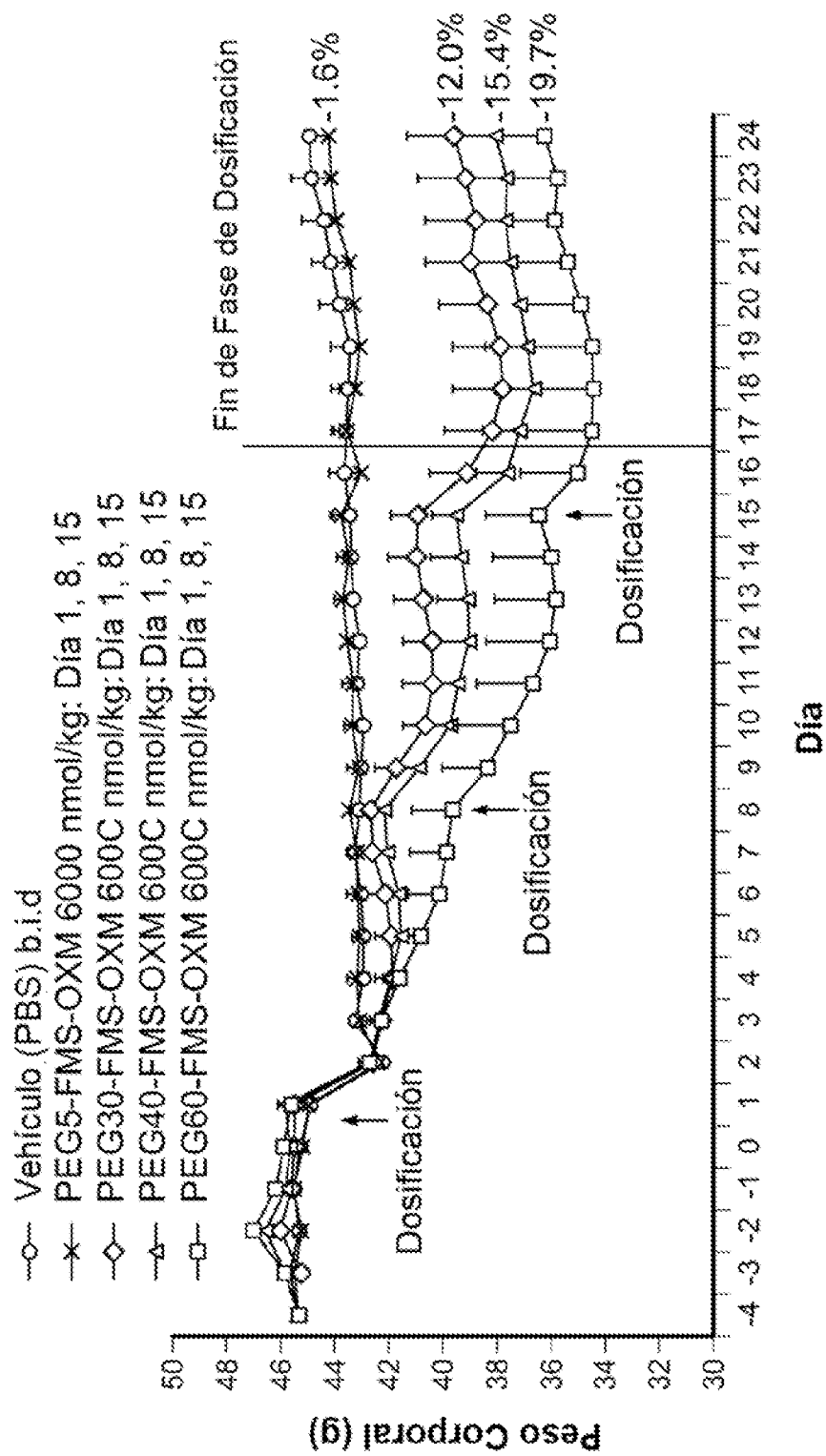


FIG. 13