



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 277 676**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97932672 .5**

(86) Fecha de presentación : **18.07.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0914341**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.1999**

(54) Título: **Antagonistas de los péptidos GLP-2 intestinotróficos.**

(30) Prioridad: **19.07.1996 US 683890**

(73) Titular/es: **1149336 ONTARIO Inc.  
19 Fernwood Road  
Toronto, Ontario M6B 3G3, CA  
NPS Allelix Corp.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.07.2007**

(72) Inventor/es: **Drucker, Daniel, J.;  
Crivici, Anna, E. y  
Sumner-Smith, Martin**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2007**

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

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

Antagonistas de los péptidos GLP-2 intestinotróficos.

**5 I. Campo de la invención**

Esta invención se refiere a péptidos relacionados con el glucagón que son antagonistas funcionales de los péptidos-2 de tipo glucagón y a su uso terapéutico para contrarrestar la hiperplasia o inducir hipoplasia de forma particular en el tejido intestinal.

**10 II. Antecedentes de la invención**

La expresión de los genes del glucagón da lugar a una variedad de productos de tipo péptido determinados por el tejido que son procesados a partir de los 160 residuos del producto proglucagón. La organización de estos péptidos en el precursor de proglucagón fue dilucidada mediante la clonación molecular de los cDNAs del preglucagón de páncreas de rana, rata, hámster y bovino. Estos análisis revelaron que el preproglucagón contiene no sólo la secuencia de glucagón y glicentina, sino también dos péptidos de tipo glucagón adicionales (GLP-1 y GLP-2) separados del glucagón y entre sí por dos péptidos espaciadores o intermedios (IP-I y IP-II). Estos péptidos son flanqueados por pares de amino ácidos básicos, característicos de los sitios clásicos de rotura de las prohormonas, sugiriendo que pueden ser liberados después del procesamiento post-traduccional del proglucagón (Drucker, Páncreas, 1990, 5(4): 484). El análisis de los péptidos liberados del proglucagón en los islotes pancreáticos de Langerhans, por ejemplo, sugiere que el péptido pancreático principal liberado es el 29-mer glucagón, mientras que la glicentina, la oxintomodulina, el IP-II y los péptidos de tipo glucagón son más frecuentes en el intestino delgado y el grueso. Esta demostración de que los péptidos de tipo glucagón se encuentran en el intestino ha provocado la investigación sobre la estructura precisa y la función(es) putativa(s) de estos péptidos del intestino recién descubiertos. La mayoría de los estudios se han focalizado en el GLP-1, debido a que varias líneas de evidencia sugieren que el GLP-1 puede ser un importante nuevo péptido regulador. Efectivamente, se ha determinado que el GLP-1 es el estímulo peptidérgico conocido más potente para la liberación de la insulina, una acción mediada de un modo dependiente de la glucosa a través de la interacción con receptores en las células  $\beta$  pancreáticas. El GLP-1 y sus derivados se encuentran en desarrollo para uso en el tratamiento de los diabéticos.

Con respecto al papel biológico del GLP-2, las solicitudes de patente en trámite U.S. No. de serie de la solicitud 08/422.540 (publicación de la solicitud PCT No. WO 96/32414), que se incorporan por referencia en su totalidad a la presente memoria, describen que el GLP-2 de mamífero actúa como un agente trófico, para favorecer el crecimiento del tejido intestinal. El efecto del GLP-2 es particularmente marcado por un crecimiento incrementado del intestino delgado. Además, las solicitudes de patente en trámite U.S. No. de serie de la solicitud 08/631.273 y solicitud de patente PCT No. PCT/CA 97/00252, incorporándose ambas en su totalidad por referencia a la presente memoria, describen que los análogos del GLP-2 de vertebrado pueden tener una actividad intestinotrófica intensificada.

**40 III. Resumen de la invención**

Ahora se ha descubierto que la alteración de la estructura del péptido GLP-2 puede dar lugar a péptidos capaces de inhibir la actividad intestinotrófica del GLP-2. De forma más particular, y de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan antagonistas que comprenden una secuencia de amino ácidos que corresponde a la de un primer GLP-2 de mamífero de referencia que ha sido mutada de modo que se han suprimido entre uno y cuatro de cualquiera de los primeros cuatro residuos N-terminales. En otro aspecto de la invención, los antagonistas que corresponden a un GLP-2 de mamífero de referencia que han sido mutados de modo que al menos un amino ácido seleccionado entre las posiciones de amino ácidos correspondientes a las posiciones de amino ácidos del GLP-2 humano en Asp<sup>25</sup>, Thr<sup>25</sup> y Thr<sup>32</sup> esté sustituido con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en dicha posición en el GLP-2 de referencia. En otro aspecto de la invención, la posición Ala<sup>2</sup> está sustituida con un amino ácido seleccionado entre el grupo que consiste en Cys, Trp, y PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>. En todavía otro aspecto de la invención, el antagonista corresponde a un polipéptido con cualquier combinación de las sustituciones y eliminaciones anteriores mutadas en relación con el GLP-2 de mamífero de referencia.

También se proporciona como un aspecto de la invención métodos de producir y de identificar antagonistas del GLP-2.

Para uso en el tratamiento médico o veterinario, se proporcionan de forma adicional por la presente invención una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad de un antagonista del GLP-2 efectiva para antagonizar la actividad del GLP-2 *in vivo*, y un soporte farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

La actividad antagonista del GLP-2 de los antagonistas de GLP-2 presentes es manifiesta *in vivo* como una reducción en la masa del tejido del intestino delgado o como una capacidad para inhibir la actividad intestinotrófica del GLP-2 o de los análogos intestinotróficos del mismo.

La presente invención proporciona el uso de péptidos de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tal como se define en las reivindicaciones añadidas.

#### **IV. Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a usos terapéuticos y relacionados de una nueva clase de antagonistas del GLP-2, de forma particular para la disminución de la velocidad de crecimiento del tejido gastrointestinal, de forma más particular del intestino delgado. El efecto biológico de los antagonistas del GLP-2 presentes se manifiesta como una disminución en el peso del intestino delgado, en relación con un control tratado de forma simulada o como una capacidad para inhibir la actividad intestinotrófica del GLP-2 o de un análogo intestinotrófico del GLP-2 en relación con un animal de control dando tanto GLP-2 como un análogo intestinotrófico de solo GLP-2.

10 Los presentes antagonistas de GLP-2 son análogos estructurales de los péptidos de GLP-2 intestinotróficos. Los péptidos del GLP-2 hacen referencia de forma colectiva a varias formas vertebradas del GLP-2 y a formas modificadas (caracterizadas por al menos una adición, eliminación, sustitución, y/o incorporación de un residuo de amino ácido con un grupo bloqueante) de los análogos del GLP-2 que todavía retienen la actividad intestinotrófica. Sin embargo, tal como se ha descrito en la presente memoria, ciertas alteraciones específicas del sitio de estos péptidos de GLP-2  
15 pueden conferir actividad antagonista al análogo alterado específicamente en el sitio.

Sin estar limitado por la siguiente explicación, se cree que las alteraciones específicas del sitio que confieren actividad antagonista interfieren con una de las actividades funcionales del péptido de la hormona de GLP-2, pero no todas las actividades funcionales. Por ejemplo, una alteración que confiere actividad antagonista al análogo del GLP-2 puede ser una que no inhiba la unión de la hormona a su receptor cognado, pero que prevenga la subsiguiente transducción de señal a través del receptor de unión. Por ejemplo, la alteración específica del sitio de la hormona puede prevenir la dimerización del receptor de hormona que es necesario para transmitir una señal al interior de la célula. Dicho mecanismo para la actividad antagonística ha sido observado con otras hormonas tales como, por ejemplo, la hormona del crecimiento humano (ver Fuh y col., Science, 1992, 256: 1677-1680).

25 De forma general, los sitios que son altamente conservados entre los GLP-2's de mamífero son candidatos para  
modificación con el fin de obtener un antagonista. Entre los mamíferos, al menos los residuos 1-5, 7, 15, y 22, 29 y  
32-33 son altamente conservados. Por consiguiente, la supresión o sustitución de los residuos en estos sitios puede  
dar lugar a un antagonista de GLP-2. De forma adicional, ciertas modificaciones de los sitios próximos a estos sitios  
30 conservados también pueden causar actividad antagonista por interrupción de la estructura de amino ácido terciario o  
colocación de los residuos adyacentes conservados.

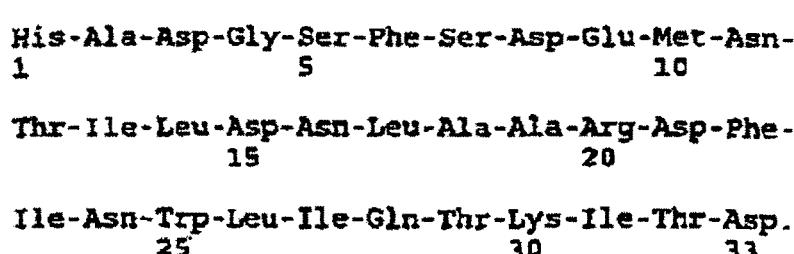
Los antagonistas de GLP-2 de la invención incluyen derivados de péptidos con una secuencia derivada de un GLP-2 de vertebrado en la que se haya eliminado uno o más de cualquiera de los primeros cuatro amino ácidos N-terminales (relativos a la secuencia del GLP-2 humano). Estos análogos son referidos en la presente invención como la clase de eliminación de los antagonistas de GLP-2. A partir de la clase de eliminación de los antagonistas de GLP-2, será apreciado que el antagonismo de GLP-2 puede resultar de la interrupción de la estructura N-terminal del GLP-2 en los primeros cuatro amino ácidos. De este modo, la clase de eliminación de los antagonistas de GLP-2 comprende: GLP-2(2-33), GLP-2(3-33), GLP-2(4-33) y GLP-2(5-33), [desAla<sup>2</sup>]GLP-2, [desAsp<sup>3</sup>]GLP-2 y [desGly<sup>0</sup>]GLP-2.

De forma adicional, los antagonistas de GLP-2 de la invención incluyen derivados de sustitución de GLP-2<sup>2</sup> de vertebrados. La clase de sustitución de antagonistas de GLP-2 incluye aquellos antagonistas que sustituyen uno de los siguientes amino ácidos a las siguientes posiciones (relativas a la secuencia del GLP-2 humano) con otro amino ácido: residuos 15, 29 y 32. También se incluyen en la clase de sustitución aquellos que incorporan ciertas sustituciones Ala<sup>2</sup>.

Se deberá entender que, en las realizaciones de la invención, los antagonistas de GLP-2 pueden incorporar cualquier combinación de una eliminación y una sustitución, o pueden incorporar dos o más sustituciones en los sitios señalados.

A. Antagonistas de *CIP*? 3

Los antagonistas de GLP-2 pueden, de acuerdo con ello, ser análogos del GLP-2 humano, que tiene la secuencia siguiente:



A no ser que se especifique de otro modo, el término "GLP-2" hace referencia a la secuencia del GLP-2 humano.

# ES 2 277 676 T3

Los antagonistas de la invención son polipéptidos que comprenden secuencias de amino ácidos que corresponden a la de un primer GLP-2 de mamífero de referencia que ha sido mutado de modo que:

- (i) se haya eliminado de uno a cuatro de cualquiera de los primeros cuatro residuos N-terminales; o
- 5 (ii) al menos un amino ácido seleccionado entre las posiciones de amino ácidos que corresponden a las posiciones de amino ácidos del GLP-2 humano a Asp<sup>15</sup>, Thr<sup>29</sup> y Thr<sup>32</sup> sea sustituido con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en dicha posición en el GLP-2 de referencia; o
- 10 (iii) la posición Ala<sup>2</sup> esté sustituida con un amino ácido seleccionado entre el grupo que consiste en Cys, Trp, y PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>; o
- (iv) se mute una combinación de (i) y (ii), o (ii) y (iii).

15 En realizaciones específicas de la invención, por ejemplo, los antagonistas de GLP-2 de la invención que son alterados en las posiciones del residuo 1, 2, 3, 4, 22, 29, 32, y/o 33 pueden ser derivados del GLP-2 de rata que es una variante de Ala<sup>15</sup> del GLP-2 humano; degu GLP-2, ox GLP-2, GLP-2 de porcino, GLP-2 de cobaya y GLP-2 de hámster, cuyas secuencias han sido descritas por varios autores incluyendo Buhl y col. en J. Biol. Chem., 1988, 263 (18): 8621.

20 Los residuos de GLP-2 que se producen en una posición específica son determinados por la alineación de secuencias de los GLP-2's aislados de diferentes especies de vertebrados y comprenden la secuencia para la secuencia humana, que se ha reproducido anteriormente.

25 Además, los antagonistas de GLP-2 de la invención que son alterados en las posiciones de los residuos 1, 2, 3, 4, 22, 29, 32, y/o 33 pueden ser derivados de los agonistas de GLP-2 tales como los descritos en la solicitudes de patentes U. S. en trámite Nos. 08/632.533 y 08/631.273, y la publicaciones de patentes PCT No. WO 96/32414 y la solicitud de patente PCT No. PCT/CA 97/00252.

30 Las sustituciones de amino ácidos apropiadas en estos sitios para rendir un antagonista pueden ser fácilmente determinadas utilizando el modelo de antagonismo de GLP-2 de murino descrito en la presente memoria. Es decir, se obtiene un compuesto de GLP-2 que incorpora una alteración estructural y a continuación es valorado en el modelo de murino exemplificado en la presente memoria para la actividad del antagonismo del GLP-2. Aquellos compuestos de GLP-2 que obtienen una disminución en el crecimiento del intestino y/o inhiben la actividad intestinotrófica del GLP-2 o de un agonista de GLP-2, son identificados en esta selección como antagonistas del GLP-2.

35 Los antagonistas de GLP-2 de la presente invención son considerados como antagonistas funcionales del GLP-2 si, cuando se valoran en el modelo de murino exemplificado en la presente invención, el antagonista: (1) media de forma consistente una disminución medible en el peso relativo del intestino delgado respecto a un animal de control que recibe sólo el vehículo; y/o (2) cuando se valoró por co-administración en dicho modelo de murino con GLP-2 o un agonista de GLP-2 (en una relación de exceso molar de preferiblemente 10:1, y más preferiblemente de 4:1 respecto al agonista) dio lugar de forma consistente a una inhibición medible del efecto intestinotrófico del GLP-2 o del agonista de GLP-2, tal como se reveló por una reducción en el incremento en el peso del intestino delgado inducido por GLP-2 administrado solo.

40 45 Son particularmente adecuados para el uso terapéutico aquellos antagonistas funcionales de GLP-2 que median una disminución del peso del intestino de al menos aproximadamente un 10% en relación con un animal control que reciba vehículo solo; son preferidos para uso terapéutico aquellos que median una disminución en el peso del intestino delgado de al menos un 15% o más.

50 La masa del intestino delgado que reduce la actividad de los antagonistas del GLP-2 presentes es notablemente más significativa en relación con el yeyuno, y de forma particular el yeyuno próximo, y también es notable en el ileon distal. De forma adicional, la actividad de los antagonistas de GLP-2 también es notable como una reducción en el peso de cripta/vellosidad del intestino delgado.

55 De forma alternativa, los antagonistas de GLP-2 pueden ser valorados utilizando el modelo de co-administración detallado anteriormente. En este caso, los antagonistas son considerados como antagonistas útiles del GLP-2 si, cuando se co-administran con GLP-2, o un análogo intestinotrófico del mismo, a una relación molar de aproximadamente 10:1, o más preferiblemente a una relación molar de aproximadamente 4:1, disminuyen la actividad del GLP-2 o de un análogo intestinotrófico del mismo en al menos un 10%, tal como se manifiesta por una reducción en el incremento en el peso del intestino delgado relativo a un animal control tratado tanto con GLP-2 como con el agonista de GLP-2 solo.

60 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método útil para identificar antagonistas del GLP-2, tales como los descritos anteriormente, que comprenden las etapas de:

- 1) obtener un análogo de GLP-2 que incorpora una alteración en la secuencia del péptido;

# ES 2 277 676 T3

- 2) tratar un mamífero con dicho análogo utilizando un régimen capaz de obtener una pérdida medible de la masa del intestino; y
- 3) determinar el efecto de dicho análogo en el peso del intestino delgado en relación con un animal control tratado de forma simulada, con lo que se identifica un antagonista del GLP-2 funcional como un análogo del GLP-2 que obtiene una disminución en dicho peso.

En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona un método de identificar un antagonista de GLP-2 que comprende las etapas de:

- (1) obtener un análogo de GLP-2 que difiere de un GLP-2 de un mamífero de referencia por tener una alteración estructural seleccionada entre (i) una eliminación de al menos un amino ácido, y (ii) una sustitución de al menos una posición de amino ácido con un amino ácido que no se presenta de forma natural en dicha posición, y (iii) una combinación de (i) y (ii);
- (2) tratar un mamífero con dicho análogo co-administrado con GLP-2 o un análogo intestinotrófico de GLP-2, utilizando un régimen capaz de obtener una reducción en el incremento de peso del intestino delgado observado cuando el GLP-2 es administrado solo, y
- (3) determinar el efecto de dicho análogo en el peso de intestino delgado relativo a un animal control, recibiendo GLP-2 solo o un análogo intestinotrófico de GLP-2 sólo, en donde dicho antagonista funcional es identificado como un análogo que observa una reducción en el incremento en dicho peso del intestino.

En una versión preferida de los métodos descritos anteriormente útiles para identificar antagonistas de GLP-2 funcionales, el análogo de GLP-2 es seleccionado a partir de los antagonistas de GLP-2 que se describen en la presente invención.

## B. Selección de Amino Ácidos sustituyentes

Los amino ácidos sustituyentes pueden ser seleccionados entre la amplia variedad de amino ácidos disponibles para los químicos especialistas en péptidos, e incluyen los D-amino ácidos así como los L-amino ácidos y sus numerosos derivados. De manera más práctica, los amino ácidos seleccionados serán susceptibles de incorporación por fase sólida o síntesis en fase solución, o por medios de producción de DNA recombinante.

En una primera selección, los análogos que son candidatos para la actividad antagonista son identificados por mutagénesis de selección de alanina u otros métodos de mutagénesis sistemáticos. Estas sustituciones de alanina son analizadas para determinar la actividad antagonista utilizando los métodos descritos en detalle en la presente memoria.

En otro aspecto de la invención, los antagonistas de GLP-2 más efectivos pueden entonces cambiar de forma drástica el carácter del residuo de amino ácido que se presenta de forma natural que es importante en la formación de interacciones estructurales (unión de hidrógeno, puentes de sal, interacciones hidrofóbicas, posiciones de residuos) de la hormona del GLP-2 que es la molécula objetivo (por ej., receptor). Con este objetivo en mente, normalmente no es necesario seleccionar cada sitio con sustituciones para todos los otros 18 residuos que se obtienen de forma natural. En su lugar, son seleccionados los miembros representativos de los grupos residuo. Generalmente, estos grupos son:

- a. residuos cargados positivamente: His, Arg y Lys
- b. residuos cargados negativamente: Asp y Glu
- c. amidas: Asn y Gln
- d. residuos aromáticos: Phe, Tyr, Trp
- e. residuos hidrofóbicos: Ala, Pro, Gly, Val, Leu, Ile, y Met
- f. residuos hidrofílicos no cargados: Ser y Thr.

Cuando se preparan estos candidatos antagonistas, se debería seleccionar un residuo a partir de un grupo diferente del tipo de residuo que se presenta de forma natural en dicha posición. Las sustituciones de extremos son generadas por selección de un residuo a partir de un grupo con combinaciones opuestas de características. Por ejemplo, un residuo cargado negativamente puede estar sustituido por un residuo cargado positivamente.

En el caso de las sustituciones de Ala<sup>2</sup>, los amino ácidos sustituyentes son seleccionados cuidadosamente de modo que den lugar a antagonistas de la actividad del GLP-2. Debe hacerse notar que las sustituciones en la posición 2 pueden tener el efecto de intensificar la actividad intestinotrófica del GLP-2. Por ejemplo, cuando se sustituye el Ala<sup>2</sup> por Gly, el resultado intensifica de forma dramática la actividad intestinotrófica así como la resistencia a la digestión del

# ES 2 277 676 T3

péptido de GLP-2 por la enzima DPP-IV. Los antagonistas de GLP-2 de la presente invención son también generados de forma sorprendente por sustitución de Ala<sup>2</sup>. En realizaciones de la invención, los amino ácidos sustituyentes en la posición 2 que son útiles para generar los antagonistas del GLP-2 están seleccionados entre Cys, Trp y PO<sub>3</sub>-Tyr. Los antagonistas de GLP-2 que incorporan estas sustituciones tienen la ventaja añadida de que dan lugar al péptido resistente a la digestión por la enzima DPP-IV. De forma preferible, el amino ácido sustituyente de Ala<sup>2</sup> es Cys.

Los amino ácidos sustituyentes para Asp<sup>15</sup>, Thr<sup>29</sup> y Thr<sup>32</sup> son seleccionados de forma deseable entre aquellos que incorporan una pequeña cadena lateral hidrofóbica, tal como Ala, Gly y Val.

En realizaciones de la invención, la clase de sustitución de los antagonistas de GLP-2 incluye: [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>33</sup>]GLP-2, [Ala<sup>11</sup>]GLP-2, [Ala<sup>15</sup>]GLP-2(2-33), [Ala<sup>35</sup>]GLP-2(3-33), [Ala<sup>35</sup>]GLP-2(4-33), [Ala<sup>25</sup>]GLP-2(5-33), [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>22</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>32</sup>]GLP-2, [Trp<sup>2</sup>]GLP-2, [PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>]GLP-2, [Cys<sup>2</sup>]GLP-2, [Ala<sup>25</sup>]GLP-2, [Ala<sup>29</sup>]GLP-2, [Ala<sup>32</sup>]GLP-2.

## 15 C. Modificaciones Adicionales para la Mejora de las propiedades de los Análogos de la Invención

Los presentes antagonistas del GLP-2, aunque incorporan una alteración estructural del tipo señalado, pueden tener varias secuencias de amino ácidos consistentes con las secuencias de GLP-2 *per se* o de los agonistas de GLP-2. Los antagonistas de GLP-2 también pueden ser análogos de agonistas de GLP-2 de vertebrados, en los que se han hecho modificaciones colaterales para intensificar otras propiedades bioquímicas, biológicas o fisiológicas del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo (en aquellos péptidos para los que se confiere antagonismo por sustitución distinta de la posición 2, la sustitución de Ala<sup>2</sup> originario por un amino ácido que da lugar al antagonista de GLP-2 resistente a la digestión por la enzima DPP-IV. Un amino ácido adecuado para este objetivo incluye de forma particular la Gly. También, el residuo de Met<sup>10</sup> puede ser sustituido por un amino ácido oxidativamente más estable, tal como Leu, Nle, Ile o Ala. Dichos análogos sustituidos de Met<sup>10</sup> son de acuerdo con ello más estables durante la síntesis, aislamiento, y almacenamiento. Otra modificación en este contexto es la sustitución del amino ácido en la posición 20 por un amino ácido distinto de Arg. En ciertas aplicaciones, particularmente para la generación sintética de péptidos farmacéuticamente o veterinariamente aceptables, esta modificación es deseable para evitar la retención por el residuo de Arg de contrapones a partir de disolventes tales como el TFA.

Dentro del alcance de la presente invención también se encuentran moléculas en las que el N- o el C-terminal han sido modificados para incorporar un grupo bloqueante del tipo utilizado de forma convencional en el estado de la técnica de la química de péptidos para proteger las terminaciones de péptidos de un ataque bioquímico y de la degradación *in vivo* no deseada.

Grupos protectores de N-terminales adecuados incluyen, por ejemplo, grupos alcanoilo de C<sub>1-5</sub> tales como acetilo. También son adecuados como grupos protectores de N-terminales los análogos de amino ácidos a los que les falta la función amino. Grupos protectores de C-terminales adecuados incluyen grupos que forman cetonas o amidas en el átomo de carbono del carboxilo del C-terminal, o grupos que forman ésteres en el átomo de oxígeno del carboxilo. Los grupos cetona y formadores de ésteres incluyen grupos alquilo, particularmente grupos alquilo de C<sub>1-5</sub> ramificados o no ramificados, por ej., grupos metilo, etilo o propilo, mientras que los grupos formadores de amida incluyen funciones amino tales como aminas primarias, o funciones alquilamino, por ej., grupos mono-alquilamino de C<sub>1-5</sub> y di-alquilamino de C<sub>1-5</sub> tales como metilamino, etilamina, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares. Los análogos de amino ácidos son también adecuados para la protección de la terminación del C-terminal de los presentes compuestos, por ejemplo, análogos de amino ácidos descarboxilados tales como agmatina.

Las realizaciones de la invención incluyen de forma específica dichos análogos en los que el grupo bloqueador del N-terminal es acetilo; y análogos en los que el grupo bloqueador del C-terminal es una amina, por ej., -NH<sub>2</sub>.

## 50 D. Síntesis de los Antagonistas del GLP-2

Los presentes antagonistas de GLP-2 pueden ser sintetizados utilizando técnicas estándar de la química de péptidos y pueden ser valorados para determinar la actividad antagonista del GLP-2, todo ello de acuerdo con la guía que se proporciona en la presente invención. Aquellos antagonistas de GLP-2 que incorporan sólo L-amino ácidos pueden ser producidos en cantidades comerciales por aplicación de tecnología de DNA recombinante. Para este objetivo, la codificación de DNA para el antagonista de GLP-2 deseado es incorporada en un vector de expresión y transformada en un microbio, por ej., levadura, u otro huésped celular, que a continuación es cultivado bajo condiciones apropiadas para la expresión del antagonista de GLP-2. Se han adaptado una variedad de sistemas de expresión de genes para este objetivo, y dirigido de forma típica la expresión del gen deseado para la expresión de elementos reguladores utilizados de forma natural para el huésped seleccionado. Debido a que el GLP-2 no requiere glicosilación post traduccional para su actividad, su producción puede conseguirse de forma conveniente en los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*. Para dicha producción, la codificación de DNA para el antagonista de GLP-2 seleccionado puede situarse de forma útil bajo controles de expresión de los genes del lac, trp o PL de la *E. coli*. como una alternativa a la expresión de la codificación de DNA para el antagonista de GLP-2 *per se*, el huésped puede ser adaptado para expresar el antagonista de GLP-2 como una proteína de fusión en la que el antagonista de GLP-2 está unido de forma liberable a una proteína de soporte que facilita el aislamiento del producto de expresión.

# ES 2 277 676 T3

En una aproximación universalmente aplicable a la producción de antagonistas de GLP-2, y una utilizada de forma necesaria para producir formas antagonistas del GLP-2 que incorporan amino ácidos no-genéticamente codificados y formas derivatizadas N- y C-terminalmente, se utilizan técnicas bien establecidas de síntesis de péptidos automatizadas, descripciones de las cuales aparecen, por ejemplo, en J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 5 2<sup>a</sup> Edición, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois; y en M. Bodanszky y A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 1984, Springer-Verlag, New York; Applied Biosystems 430A Users Manual, 1987, ABI Inc., Foster City, California. En estas técnicas, el antagonista de GLP-2 se hace crecer a partir de su C-terminal, residuo conjugado de resina por la adición secuencial de amino ácidos protegidos de forma apropiada, utilizando tanto los protocolos Fmoc como tBoc, tal como se ha descrito por ejemplo por Orskov y col., 1989, *supra*.

10 Para la incorporación de grupos protectores de N- y/o C- también pueden aplicarse protocolos convencionales para la síntesis de péptidos en fase sólida. Para la incorporación de grupos protectores de C-terminal, por ejemplo, se lleva a cabo de forma típica la síntesis del péptido deseado utilizando, como fase sólida, una resina de soporte que ha sido químicamente modificada de modo que la rotura a partir de la resina da lugar a un péptido que tiene el grupo protector 15 C-terminal deseado. Para proporcionar péptidos en los que el C-terminal soporta un grupo protector de amino primario, por ejemplo, la síntesis se lleva a cabo utilizando una resina de p-metilbencilhidrilamina (MBHA) de modo que, cuando la síntesis del péptido está completada, el tratamiento con ácido fluorhídrico libera el péptido aminado en el C-terminal deseado. De forma similar, la incorporación de un grupo protector de N-metilamina en el C-terminal se consigue utilizando resina de DVB N-metilaminoethyl-derivatizada, que con el tratamiento con HF libera el péptido que 20 soporta un C-terminal N-metilamidado. La protección del C-terminal por esterificación también puede conseguirse utilizando procedimientos convencionales. Esto supone el uso de la combinación del grupo bloqueador/resina que permite la liberación del péptido con la cadena lateral protegida a partir de la resina, para permitir la subsiguiente reacción con el alcohol deseado, para formar la función éster. Los grupos protectores FMOC, en combinación con la resina de DVB derivatizada con alcohol metoxialcoxibencilo o un grupo de unión equivalente, pueden ser utilizados para este 25 objetivo, siendo efectuada la rotura del soporte por TFA en diclorometano. La esterificación de la función carboxilo activada, por ej., con DCC, puede proceder entonces por adición del alcohol deseado, seguido por desprotección y aislamiento del producto péptido esterificado.

30 La incorporación de los grupos protectores de N-terminales puede ser conseguida aunque el péptido sintetizado esté todavía unido a la resina, por ejemplo por tratamiento con anhídrido y nitrilo adecuado. Para incorporar un grupo protector de acetilo en el N-terminal, por ejemplo, puede tratarse el péptido acoplado a la resina con anhídrido acético al 20% en acetonitrilo. El producto péptido protegido puede entonces ser separado de la resina, desprotegido y aislado de forma subsiguiente.

35 Una vez se ha sintetizado la secuencia de péptido, separada de la resina y completamente desprotegida, el péptido es entonces purificado para asegurar la recuperación de un simple oligopéptido teniendo la secuencia de amino ácidos seleccionada. La purificación puede conseguirse utilizando cualquiera de las aproximaciones estándar, que incluyen cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) en columnas de gel de sílice alquilada, por ej., gel de sílice de C<sub>4</sub>-, C<sub>6</sub>- o C<sub>16</sub>. Dicho fraccionamiento de columna está generalmente acompañado por gradientes lineales 40 de elusión, por ej., 10-90% de un disolvente orgánico de % incrementado, por ej., acetonitrilo, en tampón acuoso, conteniendo normalmente una pequeña cantidad (por ej., 0,1%) de un agente de emparejamiento tal como TFA o TEA. De forma alternativa, puede utilizarse la HPLC de intercambio iónico para separar especies de péptidos sobre la base de sus características de carga. Se recogen las fracciones de la columna, y opcionalmente se agrupan aquellas 45 que contienen el péptido de la pureza deseada/requerida. En una realización de la invención, a continuación se trata el péptido del modo establecido para intercambiar el ácido liberado (por ej. TFA) con un ácido farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, tal como acético, clorhídrico, fosfórico, maleico, tartárico, succínico o similares, para proporcionar una sal del péptido soluble en agua.

## 50 E. Usos de los Antagonistas de GLP-2 de la Invención

De acuerdo con la presente invención, se tiene la intención de administrar antagonistas de GLP-2 para tratar sujetos, incluyendo animales y humanos, que se beneficiarían de una disminución de la velocidad de crecimiento del tejido 55 gastrointestinal. En un aspecto, los sujetos candidatos son aquellos que se beneficiarían de una masa disminuida del tejido del intestino delgado. Los efectos de los antagonistas de GLP-2 en este tejido, tal como se ha evidenciado por los resultados exemplificados en la presente memoria, es dramático y beneficiaría de forma clara a aquellos sujetos que sufren de enfermedades o estados marcados por la hiperplasia en la mucosa del intestino delgado, que incluye GLP-2 que produce tumores. Otro grupo de sujetos que claramente se beneficiarían de los efectos de los antagonistas de GLP-2 son aquellos en los que sería útil inducir hipoplasia del tejido del intestino delgado, por ejemplo, sujetos que 60 en un futuro próximo recibirían radioterapia o quimioterapia o sujetos que están recibiendo radioterapia o quimioterapia. Las células epiteliales del intestino delgado están caracterizadas por una rápida división celular y de este modo son particularmente susceptibles al daño por radioterapia o quimioterapia. Efectivamente, el daño celular a las células epiteliales del intestino delgado es la causa de una mortalidad y morbosidad significativa en sujetos con cáncer sometidos a terapia. De este modo, sería deseable disminuir la velocidad de crecimiento de estas células inmediatamente 65 antes de la iniciación de estas terapias y durante el curso del tratamiento. La capacidad para disminuir la velocidad de crecimiento de las células del intestino delgado en estos sujetos, y conseguir así el descanso del intestino antes del tratamiento con quimioterapia o radioterapia, tendría el beneficio adicional de permitir dosis mayores de agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos.

Otra situación clínica en donde un antagonista funcional de GLP-2 sería de utilidad clínica es el tratamiento de un sujeto, incluyendo un animal o un humano, el cual ha sido sobre dosificado de forma crónica o aguda con GLP-2 o un agonista de GLP-2. Todavía otra aplicación potencial de los antagonistas funcionales de GLP-2 es el bloquear el transporte de toxinas u otros fármacos a través de la capa de la mucosa. Los efectos patogénicos en algunas

5 enfermedades surgen como un resultado de la absorción de toxinas o fármacos a través del epitelio del intestino. Puede ser beneficiosa la eliminación de la capacidad de absorción del intestino delgado por reducción del epitelio intestinal. Por ejemplo, algunas enfermedades tales como el cólera son letales debido a que la toxina del cólera se une a receptores en el propio epitelio intestinal, conduciendo a la deshidratación y a la muerte. Los antagonistas del GLP-2 pueden producir reposo del intestino, eliminando el tejido objetivo para la toxina (epitelio intestinal) y con ello la respuesta patológica al cólera.

10 Otro grupo de sujetos que también se beneficiarían de una disminución en la masa del intestino delgado son aquellos que sufren de obesidad, como una alternativa a la intervención quirúrgica tal como la resección del intestino delgado.

15 La eficacia terapéutica del tratamiento del antagonista de GLP-2 puede ser monitorizada por biopsia entérica para examinar la morfología de la vellosidad o por valoración bioquímica de la absorción del nutriente. De forma adicional, la eficacia puede ser valorada utilizando un relevante punto final a la situación particular tratada, por ejemplo, pérdida de peso. A los sujetos con cáncer de intestino delgado puede administrarse antagonista de GLP-2 para disminuir el 20 tamaño del tumor. De forma alternativa, los sujetos con trastornos de motilidad en el intestino, intestino irritable, y diarrea crónica pueden beneficiarse del antagonista de GLP-2 para incrementar la motilidad y/o reducir la diarrea.

25 La invención abarca tanto la co-administración del antagonista de GLP-2 con un agente radioterapéutico o un agente quimioterapéutico o la administración alternativa del antagonista de GLP-2 de modo que se reduzca el crecimiento del tejido del intestino delgado antes de la iniciación de la radioterapia o la quimioterapia. Pueden determinarse los regímenes de dosificación apropiada para los antagonistas de GLP-2 por monitorización de la reducción subsiguiente en el daño intestinal y/o el tiempo de recuperación después de la radioterapia o la quimioterapia.

30 Otro uso para los antagonistas del GLP-2 es como una terapia para la corrección de un desequilibrio de fluidos debido a un problema de mala absorción a través del intestino delgado. La eficacia del tratamiento del antagonista de GLP-2 es monitorizada por valoración del volumen de deposición, del volumen ICF y ECF, del volumen urinario y de la osmolaridad, de la presión sanguínea, y de los electrolitos en plasma.

35 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "sujeto" incluye un humano u otro mamífero, incluyendo ganado y mascotas.

#### F. Formulaciones de los Antagonistas de GLP-2

40 Para la administración a sujetos, incluyendo humanos y animales, se proporcionan antagonistas de GLP-2, en un aspecto de la invención, en forma farmacéuticamente o veterinariamente aceptable (por ej., como una preparación que es filtrada de forma estéril, por ej., a través de un filtro de  $0,22 \mu$ ) y sustancialmente libre de pirógenos. De forma deseable, el antagonista de GLP-2 a formular migra como un pico único o individualizado en HPLC, muestra con su análisis una composición y secuencia de amino ácidos uniforme y auténtica, y de otro modo cumple con los 45 estándares establecidos para los diferentes cuerpos nacionales que regulan la calidad de los productos farmacéuticos o veterinarios.

50 Para uso terapéutico, el antagonista de GLP-2 seleccionado es formulado con un soporte que sea farmacéuticamente o veterinariamente aceptable y sea apropiado para la liberación del péptido por la vía de administración seleccionada. Los soportes farmacéuticamente o veterinariamente adecuados son aquellos que son utilizados de forma convencional con los fármacos basados en péptidos, tales como diluyentes, excipientes y similares. Puede hacerse referencia al "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17<sup>a</sup> Ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1985, para guía sobre formulaciones de fármacos en general. En una realización de la invención, los compuestos son formulados para la administración por infusión o por inyección, tanto de forma sub-cutánea como intravenosa, y son utilizados de acuerdo con ello como soluciones acuosas en forma estéril y libre de pirógenos y opcionalmente tamponados hasta una ligera acidez o pH fisiológico. De este modo, los compuestos pueden ser administrados en agua destilada o, de forma más deseable, en solución salina, solución salina tamponada o solución de dextrosa al 5%. La solubilidad en agua puede ser intensificada, en el caso en que se desee, por incorporación de un intensificador de solubilidad, tal como ácido acético.

60 El soporte acuoso o vehículo puede ser suplementado para uso como inyectables con una cantidad de gelatina que sirve para depositar el antagonista de GLP-2 en o cerca del sitio de la inyección, para su liberación lenta al sitio de acción deseado. Las concentraciones de gelatina efectivas para conseguir el efecto de deposición se espera que se encuentren situadas en el intervalo de entre 10-20%. También pueden ser útiles, como agentes de deposición, agentes gelificantes alternativos, tales como ácido hialurónico.

Los antagonistas de GLP-2 de la invención también pueden ser formulados como un dispositivo de implantación de liberación lenta para la administración extendida y sostenida del antagonista de GLP-2. Ejemplos de dichas formu-

laciones de liberación sostenida incluyen composiciones de polímeros biocompatibles, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno, y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en los vehículos de liberación de fármaco han sido revisados en varias publicaciones, incluyendo, A. Domb y col., *Polymers for Advanced Technologies* 3: 279-292 (1992). Puede encontrarse una guía adicional

5 en la selección y utilización de polímeros en las formulaciones farmacéuticas o veterinarias en el texto de M. Chasin y R. Langer (eds.), "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Sciences", M. Dekker, New York, 1990. Los liposomas también pueden ser utilizados para proporcionar la liberación sostenida de un antagonista de GLP-2. Los detalles referentes a cómo utilizar y preparar formulaciones en liposomas de fármacos de interés puede encontrarse en, entre otros, en las patentes U. S. No. 4.944.948; U. S. No. 5.008.050; U. S. No. 4.921.706; U. S. No. 4.927.637; U. S. No. 10 4.452.747; U. S. No. 4.016.100; U. S. No. 4.311.712; U. S. No. 4.370.349; U. S. No. 4.372.949; U. S. No. 4.529.561; U. S. No. 5.009.956; U. S. No. 4.725.442; U. S. No. 4.737.323; U. S. No. 4.920.016. Las formulaciones de liberación sostenida son de particular interés cuando es deseable proporcionar una elevada concentración de un antagonista de GLP-2 o unos niveles de circulación prolongados.

15 El antagonista de GLP-2 puede ser utilizado en la forma de un vial o ampolla llenados de forma estéril, que contenga una cantidad del péptido efectiva para antagonizar la actividad del GLP-2 endógena, tanto en dosis unitarias como en cantidades multi-dosis. El vial o la ampolla pueden contener el antagonista de GLP-2 y el soporte deseado, como una formulación lista para la administración. De forma alternativa, el vial o ampolla puede contener el péptido de GLP-2 en una forma, tal como una forma liofilizada, adecuada para la reconstitución en un soporte adecuado, tal 20 como solución salina tamponada con fosfato.

Como formulaciones inyectables alternativas, el antagonista de GLP-2 puede ser formulado para administración por otras vías. Las formas de dosis orales, tales como comprimidos, cápsulas y similares, pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica y veterinaria estándar.

25 Finalmente, la liberación crónica del antagonista de GLP-2 para la pérdida de peso y otras indicaciones terapéuticas puede conseguirse mediante técnicas de terapia génica. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas por ingeniería genética *ex vivo* para expresar altos niveles del antagonista de GLP-2, y a continuación dichas células pueden ser implantadas en el animal o humano objeto para determinar la eficacia terapéutica.

30

#### G. Dosis de los Antagonistas de GLP-2 de la Invención

El régimen y las dosis terapéuticas más apropiadas para el tratamiento, variarán, naturalmente, con la enfermedad

35 o estado a tratar, y de acuerdo con el peso del sujeto y otros parámetros. Los resultados presentados en la presente memoria a continuación demuestran que una dosis del antagonista de GLP-2 equivalente a aproximadamente entre 1 mg/kg y 100 µg/kg (o menos) administrada dos veces al día durante 10 días puede generar una disminución muy significativa en la masa del intestino delgado. Es de esperar que dosis mucho menores, por ej., del orden del µg/kg, y una menor o mayor duración o frecuencia del tratamiento, también producirán resultados terapéuticamente útiles, es 40 decir, una disminución estadísticamente significativa en la masa del intestino delgado. Los tamaños de las dosis y del régimen de dosificación más apropiados para uso humano están guiados por los resultados presentados en la presente memoria, y pueden ser confirmados en ensayos clínicos diseñados de forma adecuada.

45 Puede determinarse una dosis y un protocolo de tratamiento efectivo por los medios convencionales, empezando con una dosis baja en animales de laboratorio e incrementando a continuación la dosis mientras se monitorizan los efectos, y variando también de forma sistemática el régimen de dosis. Pueden tenerse en cuenta numerosos factores por un clínico cuando se determina una dosis óptima para un sujeto dado. Entre éstas está la cantidad de GLP-2 que normalmente circula en plasma, que es del orden de 151 pmol/ml en el estado de reposo, aumentando hasta 225 pmol/ml después de la ingestión de nutrientes para humanos adultos sanos (C. Orskov y J. J. Holst, 1987, Scand. J. Clin. Lav. Invest. 47: 165). Factores adicionales incluyen el tamaño del sujeto, la edad del sujeto, el estado general del sujeto, la enfermedad particular a tratar, la severidad de la enfermedad, la presencia de otros fármacos en el sujeto, la actividad *in vivo* del antagonista de GLP-2 y similares. Las dosis de ensayo se seleccionarán después de tener en cuenta los resultados de los estudios en animales y la literatura clínica. Será bien apreciado por el experto en la materia que información tal como las constantes de unión y la Ki derivada de los ensayos de competencia de unión del GLP-2 55 *in vitro* también pueden ser utilizados en el cálculo de las dosis, así como la vida media calculada del antagonista de GLP-2 *in vivo*.

Una dosis para humano típica de un antagonista de GLP-2 estaría comprendida entre aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, preferiblemente entre aproximadamente 50 µg/kg/día hasta 60 aproximadamente 5 mg/kg/día, y más preferiblemente aproximadamente 100 µg/kg/día hasta 1 mg/kg/día. Tal como es de esperar los antagonistas de GLP-2 de la invención podrían ser entre 10 e incluso 100 veces más potentes que el GLP-2, una dosis típica de dicho antagonista de GLP-2 puede ser menor, por ejemplo, entre aproximadamente 100 ng/kg peso corporal/día y 1 mg/kg/día preferiblemente 1 µg/kg/día hasta 500 µg/kg/día, e incluso más preferiblemente 1 µg/kg/día hasta 100 µg/kg/día.

65

Los siguientes ejemplos describen péptidos de acuerdo con la presente invención y otros péptidos para objetivos de referencia.

# ES 2 277 676 T3

## Ejemplo 1

### *Síntesis de Antagonistas de GLP-2*

5 Se sintetizaron los siguientes péptidos antagonistas de GLP-2:

[Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>22</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>29</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>32</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>33</sup>]GLP-2; ratGLP-2(2-33); ratGLP-2(3-33); ratGLP-2(4-33); ratGLP-2(5-3); [Leu<sup>2</sup>]GLP-2; [Glu<sup>2</sup>]GLP-2; [Arg<sup>2</sup>]GLP-2; [Trp<sup>2</sup>]GLP-2; [Cys<sup>2</sup>]GLP-2; [PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>]GLP-2; y [Phg<sup>2</sup>]GLP-2.

10 Se llevó a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) de forma manual en un recipiente de 300 mililitros (ml) en una escala 3 milimolar (mmol) utilizando 6 gramos (g) de resina de clorometilo (Merrifield) (para los péptidos de ácido libre del C-terminal) con una sustitución de 0,5 miliequivalentes (meq) por gramo. Se protegieron los amino ácidos con el grupo t-butiloxicarbonilo (tBoc). Se protegieron las cadenas laterales de los amino ácidos trifuncionalizados 15 con los grupos bencilo (Bz, para la serina y la treonina), benciloximetilo (BOM, para la histidina), 2-bromobenciloxi-carbonilo (2-BrZ, para la tirosina), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-ClZ, para la lisina), ciclohexilo (cHex, para los ácidos aspártico y glutámico), y tosilo (Tos, para arginina). El primer amino ácido se acopló a la resina de clorometilo mediante esterificación del amino ácido protegido en presencia de fluoruro de potasio (KF). Se sintetizaron los péptidos con amida en el C-terminal en una resina de 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) en una escala de 3 mmol utilizando 6 20 g de resina con una sustitución de 0,5 meq/g. El primer amino ácido se acopló a la resina de MBHA de acuerdo con el procedimiento descrito para la elongación de péptidos.

La desprotección del grupo amino se llevó a cabo utilizando ácido trifluoroacético al 50% (TFA) en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), seguido por neutralización utilizando dos lavados del 10% de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se 25 llevó a cabo la elongación de péptidos utilizando la activación de N,N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DCC/HOBt) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /dimetilformamida (DMF). La cadena de péptido en crecimiento fue acabada después de cada etapa de elongación con  $\text{Ac}_2\text{O}$  del 20% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se lavó la resina con el péptido después de cada etapa de elongación, terminación y desprotección con isopropanol (iPrOH) y metanol (MeOH). Se repitieron los lavados una vez. Se prepararon los péptidos con acetil en el N-terminal por acetilación del grupo amino terminal con  $\text{Ac}_2\text{O}$  del 30 20% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , después de desprotección y neutralización tal como se ha descrito. Se separaron los productos unidos a la resina de forma rutinaria mediante un procedimiento bajo-alto utilizando fluoruro de hidrógeno (HF) contenido dimetilsulfóxido (DMS) y p-cresol como captadores.

Los péptidos en forma de crudo se purificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una 35 columna de gel de sílice de fase reversa Vydac de C18, de un tamaño de poro de 15-20  $\mu\text{m}$ , 2 pulgadas x 12 pulgadas, utilizando una elusión de gradiente con TFA del 0,1% en agua modificada con acetonitrilo. Se monitorizó la elusión a 220 nanómetros (nm). Se analizó cada fracción recogida para determinar la pureza por HPLC analítica utilizando una columna de gel de sílice de fase reversa Vydac de C18, de 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 254 milímetros (mm), utilizando una elusión de gradiente con TFA del 0,1% en agua modificada con acetonitrilo, y monitorizada a 215 nm. Las fracciones 40 que demostraron una pureza mayor del 95% se combinaron y liofilizaron. Se prepararon las sales de acetato de los péptidos a partir de las sales de TFA por disolución del polvo liofilizado en agua, con adición de acetonitrilo para ayudar a la disolución en el caso en que fuera necesario. Se pasó la solución a través de una resina de intercambio catiónico protonada Bio-Rex-70. Se lavó la resina con 5 volúmenes de agua, y se eluyó el péptido unido a la resina con ácido acético al 50% en agua. Se diluyó el eluyente con agua y se liofilizó.

45 Se analizó el polvo liofilizado final para determinar la pureza por dos métodos analíticos de HPLC de fase reversa utilizando una columna de gel de sílice de fase reversa Vydac de C18, columna de gel de sílice de fase reversa Vydac de C18, de 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 254 milímetros (mm). Se utilizaron dos sistemas de disolventes: un gradiente de agua ajustada a pH 2,25 con fosfato de trietilamina, modificado con acetonitrilo; y un gradiente de TFA al 0,1% en agua, modificado 50 con acetonitrilo. Se monitorizó el eluyente de la columna a 215 nm. Se confirmó la identidad de cada producto por análisis de amino ácidos y por espectroscopia de electrocopia de masas.

A continuación se los antagonistas de GLP-2 fueron formulados tal como se describe a continuación en el Ejemplo 2. Cada uno de los antagonistas del GLP-2 fue totalmente soluble en agua a temperatura ambiente a no ser que se 55 indicara de otro modo.

## Ejemplo 2

### *Formulación de los Antagonistas de GLP-2*

Se formularon los antagonistas de GLP-2 para inyección tanto en solución salina tamponada con fosfato como en forma de una formulación depot conteniendo gelatina. Para las preparaciones de antagonistas de GLP-2 formuladas con PBS, se preparó en primer lugar una solución de PBS de reserva 10 x, utilizando 80 g de NaCl (BDH ACS 783), 2 65 g de KCl (BDH ACS 645), 11,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Anachemia AC-8460), y 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Malinckrodt AR7100), que se llevó a un volumen total de un litro con agua destilada estéril. La solución de trabajo final se obtuvo por dilución 10:1 de la solución de reserva con agua destilada estéril y se ajustó a un pH de 7,3-7,4 en el caso en que fuera necesario, utilizando volúmenes suficientes de NaOH 10N. A continuación se trató en autoclave la solución de trabajo durante

# ES 2 277 676 T3

30 minutos. En la solución de PBS de trabajo final, las concentraciones fueron 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, y 1,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

- Se añadieron a la solución de PBS de trabajo los antagonistas de GLP-2, e forma de un péptido en polvo, tal como era necesario para generar formulaciones que tuvieran las concentraciones de péptidos necesarias. Por ejemplo, para 5 generar una solución de PBS del antagonista de GLP-2 a 130 mg/l, se disolvieron 5,2 mg del antagonista de GLP-2 en 40 ml de PBS para dar lugar a una concentración de antagonista de GLP-2 de 130 µg/ml, y se filtro de forma esterilizada. Se inyectaron 0,5 ml de la solución del antagonista de GLP-2 dos veces al día.
- 10 Para generar las formulaciones de antagonista de GLP-2 con una base de gelatina, se preparó en primer lugar una solución de gelatina por disolución de 12 gramos de gelatina (Sigma, G-8150 Lote #54H07241 de Tipo A de piel de porcino [9000-70-8] ~ 300 Bloom) en 100 ml de agua destilada. A continuación se trató en el autoclave la solución de gelatina, se calentó a 37°C, y se añadió el antagonista de GLP-2 previamente disuelto en solución salina tamponada con fosfato tal como se ha descrito anteriormente para conseguir las concentraciones de péptido específicas, deseadas.
- 15 Por ejemplo, para generar una solución de PBS con una base de gelatina del antagonista de GLP-2 a una concentración de 130 mg/l, se diluyó 10 ml de una solución de PBS preparado con 5,2 mg del antagonista de GLP-2 con 30 ml de la solución de gelatina de trabajo al 20% tal como se ha descrito anteriormente. Se mezcló la solución con un suave pipeteo, para rendir una solución final de 130 mg/l del antagonista de GLP-2 en PBS/gelatina al 15%.

## 20 Ejemplo 3

### *Ensayo para determinar la Resistencia a la Dipeptidil Peptidasa IV*

Se ensayaron los siguientes péptidos para determinar la resistencia a la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV): un péptido control, ratGLP-2; el agonista de [D-Ala<sup>2</sup>]ratGLP-2; y el agonista [Gly<sup>2</sup>]ratGLP-2. de forma adicional, también 25 se ensayaron los siguientes péptidos para determinar la resistencia a la DPP-IV: [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>22</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>29</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>32</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>33</sup>]GLP-2, [Leu<sup>2</sup>]GLP-2, [Glu<sup>2</sup>]GLP-2, [Arg<sup>2</sup>]GLP-2, [Trp<sup>2</sup>]GLP-2, [PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>]GLP-2, y [Cys<sup>2</sup>]GLP-2. Para realizar el ensayo, se añadieron 2,5 microlitros ( $\mu$ l) de una solución 30 de DPP-IV de placenta humana (Calbiochem, La Jolla, CA, cat. # 317624) conteniendo 0,125 miliunidades (mU) de enzima en glicerol al 50%, 10 mM de Tris, pH 7,8, EDTA y 0,02% de NaN<sub>3</sub> sobre 50  $\mu$ l de una solución del péptido de ensayo preparado a una concentración de 0,2 mg/ml en PBS a pH 7,4. Se incubó la mezcla a 37°C en un baño de agua circulante durante 24 horas. Se finalizó la incubación por adición de 50  $\mu$ l de una solución del péptido del 35 ensayo preparado a una concentración de 0,2 mg/ml en PBS a pH 7,4. Se incubó la mezcla a 37°C en un baño de agua circulante durante 24 horas. Se finalizó la incubación mediante la adición de 50  $\mu$ l de una solución de diprotina A preparada a una concentración de 4 mg/ml en PBS. Se ensayó cada péptido por duplicado.

Se analizó cada muestra por HPLC de fase reversa (RP) del modo siguiente: se inyectaron 90  $\mu$ l de la mezcla de 40 incubación finalizada en una columna Rainin Dynamax de 300 Å, de C18, de 5 micras, de 4,6 x 250 milímetros. Se eluyeron las muestras con ácido trifluoroacético del 0,1% (TFA) en agua modificada con acetonitrilo al 0,1% utilizando un gradiente lineal y una velocidad de flujo de 1 ml por minuto. Se detectaron los componentes de la muestra a 214 nm (nm). Se midió la extensión de la separación por la integración relativa del pico correspondiente al producto separado en comparación con la restante del péptido de referencia no digerido. Se confirmó que el producto separado del péptido control, ratGLP-2(1-33), que debería ser ratGLP-2(3-33) era el resultado de la rotura entre los residuos Ala<sup>2</sup> y Asp<sup>2</sup> por 45 comparación del tiempo de retención de este componente con respecto al del péptido sintético estándar, ratGLP-2 (3-33), y por recogida del producto de la HPLC y análisis por espectrometría de masas.

Después de 24 horas de incubación, se separaron un 22% del péptido control, ratGLP-2. No se detectaron productos 50 de no separación para los péptidos [D-Ala<sup>22</sup>]ratGLP-2, [Gly<sup>2</sup>]ratGLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>22</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>29</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>32</sup>]GLP-2, [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>33</sup>]GLP-2, [Leu<sup>2</sup>]GLP-2, [Glu<sup>2</sup>]GLP-2, [Arg<sup>2</sup>]GLP-2, [Trp<sup>2</sup>]GLP-2, [PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>]GLP-2, y [Cys<sup>2</sup>]GLP-2 después de 24 horas.

## Ejemplo 4

### *Valoración del Antagonismo del GLP-2 por Administración en Ratones*

Los receptores fueron ratones CD1 obtenidos de Charles River Laboratory (Ontario, Canadá). Los ratones CD1 fueron hembras de edades adecuadas en el momento de la inyección (n = 3-4 por grupo), de 6 semanas de edad, a no ser que se especifique de otro modo. Se dejaron los animales un mínimo de 24 horas para que se aclimataran a las instalaciones del laboratorio antes del inicio de cada experimento. Los animales se identificaron por pinzas en las orejas. No se restringió ni la dieta ni la actividad a los ratones durante los experimentos. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12 horas, entre las 6 pm y las 6 am. Los animales controles fueron de la misma edad y sexo (n = 3-4 animales). Se inyectó a los ratones de forma subcutánea, dos veces al día (b.i.d.) con 2,5 µg de péptido en un volumen total de 0,5 cc de PBS y se monitorizó de forma diaria en las instalaciones del laboratorio. Se sacrificaron los animales entre 10 y 65 14 días después de la inyección, y se mantuvieron en ayunas al menos 20 horas antes de su sacrificio.

Se anestesiaron los ratones con CO<sub>2</sub> y se ex-sanguinaron por punción cardiaca. Se recogió la sangre en 75  $\mu$ l de TED (Trasysol; EDTA (5000 KIU/ml: 1,2 mg/ml; Diprotin-A), y se centrifugó la sangre a 14 k x g durante 5 minutos

y se almacenó el plasma a -70 antes del análisis. Se separó el intestino delgado de la cavidad peritoneal, desde el piloro hasta el ceco, se limpió, se pesó y se midió. Para el objetivo comparativo, se obtuvieron secciones de cada animal a partir de la posición anatómica idéntica. Se obtuvieron los fragmentos con una medida cada uno de ellos de 1,5- 2,0 cm de longitud de  $8 \pm 2$  cm,  $18 \pm 2$  cm,  $32 \pm 2$  cm desde el piloro par histomorfometría representando el yeyuno 5 próximo, el yeyuno distal y el íleo distal. Cada fragmento del intestino delgado se abrió de forma longitudinal en su borde antimesentérico en un bloque de tejido y a continuación se colocó en formalina al 10% (vol./vol.) toda la noche, y a continuación se transfirió a EtOH al 70%.

10 Se calculó el cambio de porcentaje en el peso del intestino delgado por división del cambio promedio en el peso de intestino del ratón tratado con el antagonista, en relación con el ratón tratado con sólo vehículo, por el peso promedio del intestino del ratón tratado con sólo vehículo, y multiplicando este número por 100.

TABLA 1

Antagonista de GLP-2	% de Disminución del Peso del Intestino Delgado
[Gly <sup>2</sup> , Ala <sup>15</sup> ]GLP-2	14
[Gly <sup>2</sup> , Ala <sup>22</sup> ]GLP-2	8
[Gly <sup>2</sup> , Ala <sup>29</sup> ]GLP-2	19
[Gly <sup>2</sup> , Ala <sup>32</sup> ]GLP-2	17
[Gly <sup>2</sup> , Ala <sup>33</sup> ]GLP-2	6
[Leu <sup>2</sup> ]GLP-2	23
[Glu <sup>2</sup> ]GLP-2	25
[Arg <sup>2</sup> ]GLP-2	23
[Trp <sup>2</sup> ]GLP-2	5
[Cys <sup>2</sup> ]GLP-2	20
[PO <sub>3</sub> -Tyr <sup>2</sup> ]GLP-2	6
[Phg <sup>2</sup> ]GLP-2	2

45 Estos resultados establecen que los antagonistas del GLP-2 humano que contienen sustituciones de los residuos conservados en las posiciones 15, 29, 32 o 33 con un residuo de alanina causarán realmente una *disminución* en el peso del intestino delgado cuando se injecten en ratones. En contraste, los análogos del GLP-2 humano que contienen un residuo de tipo salvaje en estas posiciones (pero que contienen la sustitución Gly<sup>2</sup>) *incrementarán* en peso del intestino delgado cuando se injecten en ratones utilizando un protocolo experimental idéntico (los datos no se muestran). Por consiguiente, concluimos que la sustitución de los residuos en las posiciones 15, 29, 32, o 33 interrumpen parcialmente la actividad funcional del GLP-2 y dan lugar a un antagonista de GLP-2.

50 De forma adicional, estos datos también muestran el resultado extremadamente sorprendente de que las sustituciones de la posición Ala<sup>2</sup> con un residuo amino ácido diferente de Gly, de forma específica Leu, Glu, Arg, Trp, Cys, PO<sub>3</sub>-Tyr, y Phg, dará lugar a la actividad antagonística.

##### 55 Ejemplo 5

###### Valoración del Antagonista de GLP-2 por Co-Administración en Ratones con GLP-2

60 Se disolvieron el antagonista del péptido candidato y rat GLP-2 en PBS para dar una relación final de 25 µg de antagonista/2,5 µg de GLP-2 por 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (para una relación 10:1), o 12,5 µg de antagonista/2,5 µg de GLP-2 por 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (para una relación 4:1), tal como se ha indicado. Se administró la mezcla antagonista/GLP-2 a ratones hembras CD1 de 6-8 semanas de edad, de forma subcutánea, siendo la cantidad de péptido inyectada de 25 µg de antagonista/ 2,5 µg de GLP-2 en 0,5 ml dos veces al día, o de 12,5 µg de antagonista/ 2,5 µg de GLP-2 en 0,5 ml dos veces al día. Después de 10-14 días, se sacrificaron los ratones a los que se inyectó el péptido y los ratones control (a los que se inyectó solución salina), y se determinaron los pesos de los intestinos delgados.

## ES 2 277 676 T3

TABLA 2

#	Antagonista de GLP-2	% de Antagonismo	Relación del Antagonista respecto al GLP-2 administrado [en peso]
1	ratGLP-2(2-33)	42	10:1
2	ratGLP-2(3-33)	33	4:1
3	ratGLP-2(4-33)	32	10:1
4	ratGLP-2(5-33)	16	10:1

Estos resultados ilustran que las eliminaciones de los primeros uno a cuatro residuos de GLP-2 dan lugar a un antagonista que antagonizará la actividad intestinotrófica del rat GLP-2 cuando se co-inyecte en ratones experimentales. Estos resultados son significativos por al menos dos razones. Primero, estos datos revelan que el terminal del extremo amino de los péptidos de GLP-2 está implicado en el efecto intestinotrófico del GLP-2. Por consiguiente, otras alteraciones que interrumpan este terminal, por ejemplo, las sustituciones de amino ácidos con propiedades opuestas, en lugar de eliminaciones, probablemente también transmitirán actividad antagonística al análogo resultante. En segundo lugar, la co-administración del antagonista y del GLP-2 servirá para disminuir o incluso eliminar el efecto intestinotrófico del GLP-2. Por consiguiente, los antagonistas de GLP-2 pueden ser administrados a un sujeto en situaciones en las que se produzca el exceso de producción de GLP-2, por ejemplo, un sujeto con un tumor que segregue GLP-2 y/o responda de forma trófica al péptido de GLP-2.

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5        1. Un polipéptido análogo de un péptido de GLP-2 de mamífero, en donde el análogo inhibía la actividad intestino-trófica del péptido de GLP-2, comprendiendo una secuencia de amino ácidos que consista en un GLP-2 de mamífero de referencia e incorpore, en relación al péptido de GLP-2, una o más mutaciones estructurales seleccionadas entre (i) la eliminación de uno a cuatro de cualquiera de los primeros cuatro residuos N-terminales del péptido de GLP-2, (ii) sustitución de al menos un amino ácido que se encuentre en el péptido de GLP-2 en una posición seleccionada entre Asp<sup>15</sup>, Thr<sup>29</sup> y Thr<sup>32</sup> con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en la posición en el GLP-2 de referencia; y (iii) sustitución del Ala<sup>2</sup> en el péptido de GLP-2 con un amino ácido seleccionado entre el grupo que consiste en Cys, Trp, y PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>.
- 10      2. El polipéptido tal como se ha definido en la reivindicación 1, en donde el GLP-2 de mamífero de referencia esté seleccionado entre el grupo que consiste en GLP-2 humano, degu GLP-2, ox GLP-2, GLP-2 de porcino, GLP-2 de cobaya y GLP-2 de hámster.
- 15      3. El polipéptido tal como se ha definido en la reivindicación 1 o 2, en donde el GLP-2 de mamífero de referencia es el GLP-2 humano.
- 20      4. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, de modo que dicho péptido tenga una sustitución en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Asp<sup>15</sup>, Thr<sup>29</sup> y Thr<sup>32</sup>, con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en dicha posición en el GLP-2 de referencia.
- 25      5. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, de modo que dicho péptido esté seleccionado entre el grupo que consiste en [Trp<sup>2</sup>]GLP-2, [PO<sub>3</sub>-Tyr<sup>2</sup>]GLP-2, y [Cys<sup>2</sup>]GLP-2.
- 30      6. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 que es GLP-2 (2-33).
- 35      7. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 que es GLP-2 (3-33).
- 40      8. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 que es GLP-2 (4-33).
- 45      9. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 que es GLP-2 (5-33).
- 50      10. El polipéptido tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo péptido comprende además una o más sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en: (i) sustitución de Ala<sup>2</sup> con Val, Gly, o D-Ala; (ii) sustitución de Met<sup>10</sup> con Leu, Ile, Nle, o Ala; (iii) un grupo del bloqueo del amino terminal; y (iv) un grupo de bloqueo del terminal carboxi.
- 55      11. El polipéptido tal como se ha definido en la reivindicación 10, seleccionado entre el grupo que consiste en: [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>22</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>29</sup>]GLP-2; [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>32</sup>]GLP-2; y [Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>33</sup>]GLP-2.
- 60      12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 65      13. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer del intestino delgado, un trastorno de motilidad del intestino, síndrome del intestino irritable, diarrea crónica, u obesidad clínica en un sujeto.
- 70      14. uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la fabricación de un medicamento para la reducción de la hiperplasia o la inducción de la hipoplasia del intestino delgado en un sujeto.
- 75      15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el sujeto está sufriendo de obesidad o un sujeto que requiera reposo del intestino antes del tratamiento con quimioterapia o radioterapia.
- 80      16. Uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la fabricación de un medicamento para la mejora de un efecto patológico o síndrome de una enfermedad gastrointestinal.
- 85      17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde la enfermedad gastrointestinal está seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer del intestino delgado, cólera, intestino irritable, trastornos de motilidad del intestino y diarrea crónica.
- 90      18. Un método de identificar un antagonista de GLP-2 que comprende las etapas de:
- 95      (1) obtener un análogo de GLP-2 que difiera de un GLP-2 de mamífero de referencia por tener una alteración estructural seleccionada entre (i) una eliminación de al menos un amino ácido, y (ii) una sustitución de al menos una posición de amino ácido con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en dicha posición, y (iii) una combinación de (i) y (ii);

# ES 2 277 676 T3

(2) tratar un mamífero con dicho análogo utilizando un régimen capaz de obtener una disminución en el peso del intestino delgado; y

5 (3) determinar el efecto de dicho análogo en el peso del intestino delgado en relación a un mamífero de control que reciba sólo vehículo, en donde dicho antagonista funcional de GLP-2 esté identificado como un análogo que obtenga una disminución en dicho peso del intestino delgado.

19. Un método de identificar un antagonista de GLP-2 que comprenda las etapas de:

10 (1) obtener un análogo de GLP-2 que difiera de un GLP-2 de mamífero de referencia por tener una alteración estructural seleccionada entre (i) una eliminación de al menos un amino ácido, y (ii) una sustitución de al menos una posición de amino ácido con un amino ácido que no se encuentre de forma natural en dicha posición, y (iii) una combinación de (i) y (ii);

15 (2) tratar un mamífero con dicho análogo utilizando co-administrado con GLP-2 o un análogo intestinotrófico de GLP-2, utilizando un régimen capaz de obtener una reducción en el incremento de peso del intestino delgado observado cuando el GLP-2 es administrado solo; y

20 (3) determinar el efecto de dicho análogo en el peso del intestino delgado en relación a un animal de control, que reciba sólo GLP-2 o un análogo intestinotrófico de GLP-2 solo, en donde dicho antagonista funcional esté identificado como un análogo que obtenga una reducción en el incremento en dicho peso del intestino.

20. El método tal como se ha definido en la reivindicación 18 o 19, en donde la alteración estructural del análogo de GLP-2 sea una eliminación de entre uno y cuatro de cualquiera de los primeros cuatro residuos N-terminales.

25 21. El método tal como se ha definido en la reivindicación 18 o 19, en donde la alteración estructural del análogo de GLP-2 sea una sustitución en una posición seleccionada entre Asp<sup>15</sup>, Phe<sup>22</sup>, Thr<sup>29</sup>, Thr<sup>32</sup> y Asp<sup>33</sup>.

22. Una célula huésped transformada con una construcción de expresión de polinucleótido que codifique un polipeptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

35

40

45

50

55

60

65