

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 353 728**

⑯ Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

C12N 5/071 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **00913417 .2**

⑯ Fecha de presentación : **10.02.2000**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1189629**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **27.03.2002**

⑯ Título: **Péptido YY (PYY) para tratar trastornos metabólicos de la glucosa.**

⑯ Prioridad: **10.02.1999 US 119577 P**

⑯ Titular/es: **CURIS, Inc.**
61 Moulton Street
Cambridge, Massachusetts 02138, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOP: **04.03.2011**

⑯ Inventor/es: **Lu, Huang-Hui y**
Pang, Kevin

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **04.03.2011**

⑯ Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 353 728 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

PÉPTIDO YY (PYY) PARA TRATAR TRASTORNOS METABÓLICOS DE LA GLUCOSACampo de la invención

5 La invención se refiere a usos para tratar trastornos metabólicos de la glucosa (por ejemplo, intolerancia a la glucosa, resistencia a insulina, hiperglucemia, hiperinsulinemia y diabetes mellitus de tipo II). Las terapias se basan en el descubrimiento de que el PYY induce 10 sensibilidad a glucosa en islotes pancreáticos fetales y adultos.

Antecedentes de la invención

La diabetes es una de las enfermedades crónicas más 15 frecuentes en los Estados Unidos y una causa importante de muerte, afectando a más de 400 millones de diabéticos en el mundo hoy en día. Los cálculos aproximados basados en la Encuesta nacional de entrevistas de salud de 1993 (NHIS) indican que la diabetes se ha diagnosticado en el 1% de la población de EE.UU. de edad <45 años, el 6,2% de aquellos 20 tienen 45-64 años, y el 10,4% de aquellos tienen >65 años. A partir de 1995, una estimación de 8 millones de personas en los Estados Unidos refirió tener esta afección crónica.

Se ha estimado que el coste total de la diabetes en los Estados Unidos es 92\$ billones anuales, que incluye gastos 25 de productos médicos, hospitalización y el valor de trabajo perdido. Los costes sustanciales tanto a la sociedad como a sus ciudadanos son incurridos no sólo por los costes directos de cuidados médicos para la diabetes, sino también por los costes indirectos que incluyen productividad perdida 30 resultante de morbilidad relacionada con la diabetes y mortalidad prematura. Las personas con diabetes están en riesgo de complicaciones importantes que incluyen cetoacidosis diabética, enfermedad renal terminal, retinopatía diabética y amputación. También hay una gran cantidad de afecciones directamente menos relacionadas tales 35 como hipertensión, enfermedad cardiaca, enfermedad vascular periférica e infecciones, para las que las personas con

diabetes tienen un riesgo sustancialmente elevado.

La diabetes mellitus es un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas que conducen a elevación crónica de la glucosa en la sangre (hiperglucemia). La diabetes se 5 caracteriza por la destrucción de islotes pancreáticos o disfunción que conduce a la pérdida de la regulación de la glucosa. Los dos tipos principales de diabetes mellitus son tipo I, también conocida como "diabetes dependiente de insulina" ("IDDM") o "diabetes de aparición juvenil", y tipo 10 II, también conocida como "no dependiente de insulina" ("NIDDM") o "diabetes de aparición en la madurez".

La IDDM resulta de una destrucción autoinmunitaria de células β pancreáticas con la consiguiente pérdida de la producción de insulina, que produce hiperglucemia. Los 15 diabéticos de tipo I requieren terapia de sustitución de insulina para garantizar la supervivencia. Mientras que medicaciones tales como insulina inyectable e hipoglucemiantes orales permiten que los diabéticos vivan más, la diabetes sigue siendo la tercera causa de muerte más importante, después de enfermedad cardiaca y cáncer. Sin embargo, estas medicaciones no controlan suficientemente bien los niveles de azúcar en sangre para evitar la oscilación entre niveles altos y bajos de azúcar en sangre, produciendo lesión de los riñones, los ojos y los vasos 20 sanguíneos. Los datos del Ensayo de control y de complicaciones de diabetes (DCCT) muestran que el intenso control de la glucosa en sangre retrasa significativamente complicaciones de la diabetes tales como retinopatía, nefropatía y neuropatía en comparación con la terapia 25 convencional que consiste en una o dos inyecciones de insulina al día. La terapia intensiva en el DCCT incluyó inyección múltiple de insulina tres o más veces por día o infusión de insulina subcutánea continua (CSII) por bomba externa. Las bombas de insulina son una de una variedad de 30 soluciones alternativas a las inyecciones diarias múltiples subcutáneas (MDI) para solucionar la sustitución fisiológica de insulina.

La diabetes de tipo II se caracteriza por hiperglucemia en presencia de niveles superiores a los normales de insulina en plasma (hiperinsulinemia) y representa más del 90% de todos los casos y casi siempre se produce en adultos con sobrepeso de más de 40 años. La progresión de la diabetes de tipo II está asociada a aumento de las concentraciones de glucosa en sangre acoplado a una disminución relativa en la tasa de secreción de insulina inducida por glucosa. En la diabetes de tipo II se cree que los procesos de tejido que controlan el metabolismo de los carbohidratos tienen una disminución de la sensibilidad por la insulina y, por tanto, no se producen a partir de una falta de producción de insulina, sino de una disminución de la sensibilidad por aumentar los niveles de glucosa en la sangre y una incapacidad para responder produciendo insulina. Alternativamente, la diabetes puede resultar de diversos defectos en la maquinaria molecular que median en la acción de insulina sobre sus células diana, tal como una falta de receptores de insulina en sus superficies celulares. Por tanto, el tratamiento de la diabetes de tipo II no requiere frecuentemente la administración de insulina, pero puede basarse en cambios de dieta y de estilo de vida, aumentada por la terapia con agentes hipoglucemiantes orales tales como, por ejemplo, sulfonilurea.

La porción endocrina del páncreas está compuesta por los islotes de Langerhans, que aparecen como grupos redondeados de células de islotes incorporadas dentro del páncreas exocrino. Cuatro tipos de células de islotes componen la porción endocrina del páncreas: (1) células alfa (α), que constituyen el 20% de las células de islotes, que secretan glucagón, una hormona que aumenta los niveles de azúcar en sangre; (2) células beta (β), que secretan insulina, una hormona que reduce los niveles de azúcar en sangre; (3) células delta (δ), que secretan hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH) o somatostatina, una hormona que inhibe la secreción de insulina y glucagón; y (4) células φ , o células de

polipéptido pancreático (PP), que sintetizan polipéptido pancreático. El glucagón actúa sobre varios tejidos para poner a disposición energía en los intervalos entre las comidas. En el hígado, el glucagón produce la rotura del glucógeno y promueve la gluconeogénesis a partir de precursores de aminoácidos. El polipéptido pancreático inhibe la secreción exocrina pancreática de bicarbonato y enzimas, produce la relajación de la vesícula biliar y disminuye la secreción de bilis. Se sabe que la insulina produce el almacenamiento de nutrientes en exceso que se producen durante y poco después de comer. Los principales órganos diana para la insulina son el hígado, el músculo y los órganos adiposos especializados para el almacenamiento de energía.

La célula más abundante en los islotes, que constituyen el 60-80% de las células, es la célula β productora de insulina. Las células β del páncreas fetal humano son diferentes de las células β pancreáticas adultas porque liberan poca o ninguna insulina en respuesta a glucosa (véase, por ejemplo, Tuch, B.E. y col. (1992) *J. Endocrin.* 132:159-67). Esto se ha observado tanto en seres humanos como en roedores, y la respuesta a insulina retardada se parece a la glucosa observada en pacientes con diabetes de tipo II o insulinoma maligno. (Hellerström y Swenne (1991) *Diabetes* 40(2):89-93; Tuch y col., anteriormente). No se cree que la incapacidad de las células β fetales para producir insulina en respuesta a glucosa sea debida a una incapacidad para procesar precursores de insulina. Las células β humanas adultas sintetizan preproinsulina y convierten ésta en proinsulina (hPI) en el retículo endoplásmico. Después de esto, la hPI se disocia en insulina y péptido C mediante una ruta regulada en los gránulos secretores. La tasa de conversión de hPI en la célula β adulta es alta, produciendo una baja relación de hPI:insulina en lo que respecta tanto al contenido como a la secreción (Gold y col. (1981) *Diabetes* 30:77-82). Esto también se observa para células β fetales, sugiriendo que la

inmadurez de las células β no es debida a diferencias en el almacenamiento y la liberación de proinsulina (Tuch y col., anteriormente). La liberación aguda de tanto hPI como de insulina de la célula β fetal en respuesta a un aumento en Ca^{2+} y cAMP sugiere que la célula libera sus productos secretores mediante una ruta regulada, en vez de una constitutiva (Rhodes y Halban (1987) *J. Cell Biol.* 105:145-53).

Se cree que la falta de sensibilidad a glucosa en células β fetales es debida al metabolismo de la glucosa inmadura. El mecanismo molecular subyacente a la secreción de insulina inducida por glucosa en células β adultas implica el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) en la membrana plasmática, inhibiéndose así la salida de K^+ a través de los canales de K^+_{ATP} , conduciendo a la despolarización de la membrana celular (Jones, P.M. y Persaud, S.J. (1998) *Endocrine Reviews* 19(4):429-61; Mendonca y col., anteriormente; Cook, D.L. y Hales C.N. (1984) *Nature* (Londres) 311:271-73). Por consiguiente, la concentración de Ca^{2+} citosólica aumenta como resultado de la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} de tipo L (sensibles al voltaje). La glucosa aumenta la concentración intracelular de cAMP y de reguladores derivados de los fosfolípidos de membrana que incluyen inositol trifosfato (IP_3), diacilglicerinas (DAG), ácido araquidónico (AA) y ácido fosfatídico (véase Jones y Persaud, anteriormente). Se ha sugerido que la reducción de la secreción de insulina en respuesta a glucosa refleja el desacoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la despolarización de células de la membrana (Mendonca y col., anteriormente). Los estudios indican que el canal de K^+ sensible a ATP, aunque esté completamente desarrollado, no está regulado adecuadamente en la célula β fetal y que la respuesta secretora deficiente a glucosa puede reflejar un metabolismo de la glucosa mitocondrial inmadura que produce una incapacidad para cerrar el canal de K^+ sensible a ATP de otro modo normal (Hellerström y Swenne, anteriormente).

El desarrollo pancreático se produce en etapas discretas y está regulado por las hormonas endocrinas producidas por las propias células pancreáticas o por otros tejidos. En la rata, el primordio pancreático se forma en el 5 día embrionario ("e") 10,5 ("e10,5") por fusión de las yemas primordiales pancreáticas dorsales y ventrales que se producen como protrusiones a partir del endodermo duodenal (Pictet, R. y Rutter, W.J. (1972) "Development of the Embryonic Endocrine Pancreas" en D. Steiner y N. Freinkel 10 (eds.) *Handbook of Physiology*, The Endocrine Pancreas, vol. 1, sección 8, Am. Physiol. Soc., pág. 25-66; Myrsén-Axcrona, U. y col. (1997) *Regulatory Peptides* 68:165-75). Las hormonas de islotes aparecen secuencialmente en el páncreas en desarrollo: por ejemplo, el glucagón aparece en e10 en 15 ratón y e11 en rata, las células productoras de insulina aparecen en e12, las células productoras de somatostatina aparecen en e17 (véase Myrsén-Axcrona y col., anteriormente). Se cree que las células de islotes pancreáticos se diferencian en la respuesta a señales 20 endocrinas a partir de una célula precursora común en los conductos pancreáticos. En algún momento entre el final de la etapa fetal de la rata (e21) y las etapas neonatales (después del nacimiento), las células β fetales adquieren la capacidad de secretar insulina en respuesta a glucosa. La 25 respuesta de la insulina a esta edad es monofásica y no está bloqueada por antagonistas de Ca^{2+} . Un patrón bifásico evidente de la secreción de insulina en respuesta a glucosa se detecta sólo 3 días después del nacimiento (Mendonca, A.C. y col. (1998) *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31(6):841- 30 46). No se conoce el mecanismo por el que este "aumento de la función" o "aumento de la capacidad de respuesta a glucosa" se logra, ni han sido identificados o caracterizados los factores que regulan la maduración y el aumento de la función. Además, no se conocen los cambios 35 fisiológicos asociados al aumento de la capacidad de respuesta a glucosa en células β pancreáticas.

La presente invención se basa en el descubrimiento de

que un factor, "péptido yY" o "PYY" desencadena o aumenta la función en islotes fetales y de adulto insensibles a glucosa que conduce a la capacidad de respuesta a glucosa y, por tanto, proporciona terapias para enfermedades que afectan el metabolismo de la glucosa tales como diabetes de tipo II.

5 Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que PYY puede inducir y mantener la capacidad de respuesta a glucosa en islotes pancreáticos fetales y adultos. Por ejemplo, los inventores muestran que el tratamiento de islotes de e21 insensibles a glucosa de páncreas de rata fetal durante cinco días con PYY *in vitro* indujo la maduración de los islotes, que entonces respondieron a glucosa liberando insulina. Los inventores también muestran que la sensibilización a glucosa puede recuperarse en islotes adultos mediante tratamiento con PYY, y que la sensibilización a glucosa puede mantenerse durante más tiempo en islotes adultos tratados con PYY. Antes de la presente invención, en la técnica no se habían identificado previamente factores tróficos o de crecimiento que pudieran estimular la maduración de islotes.

Se describe un método para alterar el estado diferenciado de células de islotes pancreáticos que comprende administrar a los islotes o células β pancreáticos aislados un péptido PYY o agonista de PYY (por ejemplo, que imita o potencia) de la actividad de PYY, denominado colectivamente en este documento "agente terapéutico de PYY". Según la invención, la administración de un péptido PYY como se define en las reivindicaciones hace que los islotes o células sean sensibles a glucosa. Los islotes o células sensibles a glucosa se estimulan así para producir insulina cuando se exponen a glucosa. También se describen métodos para inducir que los islotes expresen marcadores indicativos de islotes maduros o que las células β expresen marcadores indicativos de células β maduras poniendo en

contacto los islotes o células β con un agente terapéutico de PYY. En una realización preferida, los islotes o células son islotes o células β pancreáticos humanos.

Además, se describen métodos para preparar islotes o células β pancreáticos sensibles a glucosa que comprendan administrar a islotes o células β pancreáticos insensibles a glucosa una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente terapéutico de PYY.

También se describe un método para modificar el metabolismo de la glucosa en un animal que comprende administrar al animal una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente terapéutico de PYY y un vehículo farmacéuticamente aceptable con el fin de potenciar la sensibilidad a glucosa de las células β pancreáticas. La invención proporciona un uso para tratar una enfermedad asociada al metabolismo alterado de la glucosa de una composición que comprende un péptido PYY como se define en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para aumentar la sensibilidad a glucosa de células β pancreáticas.

En otro aspecto, la invención proporciona islotes y células β diferenciados generados poniendo en contacto islotes o células sin diferenciar de un organismo vertebrado con un péptido PYY como se define en las reivindicaciones. En una realización preferida, la invención proporciona islotes o células β pancreáticos que secretan insulina en respuesta a glucosa y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración farmacéutica a un animal, en el que la composición celular puede secretar insulina *in vivo* en respuesta a glucosa.

También se describe un método para tratar una enfermedad asociada al metabolismo alterado de la glucosa que comprende administrar a un animal una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende islotes o células β pancreáticos que han aumentado la sensibilidad a glucosa mediante tratamiento con un agente

terapéutico de PYY según la invención. Por ejemplo, los islotes o células sensibles a glucosa obtenidos tratando islotes o células β pancreáticos con un agente terapéutico de PYY se administran a un animal en una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para aumentar la sensibilidad a glucosa del animal. Por ejemplo, la composición de células sensibles a glucosa tratadas con PYY comprende agentes adicionales tales como un agente terapéutico de PYY. La composición de células puede administrarse conjuntamente tanto simultánea, secuencial como por separado con un agente terapéutico de PYY. Los usos de la invención pueden ser para tratar una enfermedad que está asociada a una afección tal como resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa o falta de sensibilidad a la glucosa, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia en un animal. En una realización preferida, la presente invención se usa para tratar diabetes mellitus de tipo II.

Los péptidos PYY preferidos incluyen polipéptidos que se corresponden con una proteína PYY madura. El péptido PYY es preferentemente un PYY de mamífero, por ejemplo, codificado por un gen PYY de mamífero e incluso más preferentemente una proteína PYY humana, por ejemplo, tal como se representa en SEQ ID NO:2. En ciertas realizaciones, el péptido PYY será idéntico al menos el 70 por ciento a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y más preferentemente al menos el 80, 85, 90 o el 95 por ciento idéntico. En ciertas realizaciones, el péptido PYY puede codificarse por un ácido nucleico que se hibrida a SEQ ID NO:1 bajo condiciones de rigurosidad que incluyen una etapa de lavado con 2,0 x SSC a 65°C, e incluso más preferentemente bajo condiciones de rigurosidad que incluyen una etapa de lavado con 0,2 x SSC a 65°.

En otra realización preferida, el péptido PYY como se define en las reivindicaciones va a administrarse a un animal con un agente que puede inhibir la degradación del agente terapéutico de PYY tanto simultánea, secuencial como

por separado con el agente terapéutico de PYY. En una realización preferida, el agente se coadministra con el agente terapéutico de PYY. Los inhibidores son inhibidores de dipeptidilpeptidasa. También se describe que el agente se administra con islotes o células pancreáticos que se habían hecho sensibles a glucosa mediante tratamiento con un agente terapéutico de PYY según la invención. Por ejemplo, el agente se administra con PYY e islotes o células pancreáticos que se habían hecho sensibles a glucosa mediante tratamiento con un agente terapéutico de PYY.

10 También se describe un agente terapéutico de PYY que es un compuesto que se une a un receptor de PYY tal como el receptor Y1 de PYY, e imita (agonista) la actividad de PYY. Tales agentes pueden ser pequeñas moléculas orgánicas, por ejemplo, que tienen un peso molecular inferior a 7000 uma, y más preferentemente inferior a 5000 uma, 1000 uma, o incluso 500 uma. Los agonistas pueden usarse para inducir y/o mantener la sensibilización a glucosa. Los agonistas pueden usarse para inhibir o suprimir de otro modo la sensibilización a glucosa, por ejemplo, para tratar hiperinsulinemia o hiperglucemia.

15 La invención proporciona un método para mantener la función normal de islotes pancreáticos (es decir, sensibilidad a glucosa) en trasplantes de islotes o células que comprende administrar *ex vivo* un péptido PYY como se define en las reivindicaciones. De esta forma, los islotes o células pancreáticos donantes que van a trasplantarse en un hospedador animal pueden mantenerse como funcionales con respecto a su capacidad para responder a glucosa produciendo insulina. Alternativamente, las células de islotes pancreáticos pueden ser células β defectuosas autólogas del hospedador que se tratan con un péptido PYY para enriquecerlas para células sensibles a glucosa o para revivir su sensibilidad a glucosa antes de la reimplantación en el animal.

20 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para identificar un agonista de PYY que comprende

administrar a islotes o células pancreáticos fetales, o células pancreáticas adultas que son insensibles a glucosa, una cantidad eficaz de un agente y comparar la respuesta celular del agente con la respuesta celular a PYY.

5 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para cribar una biblioteca de ADN para la presencia de un gen que codifica un agonista de PYY. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias de genes de forma que el 10 conjunto degenerado de posibles secuencias de PYY sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente como un conjunto de proteínas de fusión más largas (por ejemplo, para la expresión en fago) que contiene el conjunto de secuencias de PYY en su interior.

15 También se describe en este documento un ensayo diagnóstico para evaluar si un paciente que se sospecha que tiene un trastorno metabólico de la glucosa tiene o no un defecto en sus funciones de PYY. Por ejemplo, el ensayo puede detectar niveles de PYY en suero u otro fluido corporal. El ensayo puede detectar mutaciones del gen PYY, por ejemplo, que efectúa la secreción, semivida en suero o potencia de la proteína codificada. El método objetivo puede usarse para determinar si un paciente tiene un gen PYY que lleva una mutación en la secuencia de la señal de secreción 25 que disminuye el nivel de secreción de la proteína.

30 En otra realización más, la invención proporciona un animal vertebrado no humano transgénico en el que las rutas inductivas de PYY son inhibidas en uno o más tejidos de dicho animal mediante la interrupción de un gen que codifica PYY.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e 35 inmunología que están dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se describen en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2^a ed.,

Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y col., la patente de EE.UU. nº: 5 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Harnes & S. J. Higgins, eds., 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, vol. 154 y 155 (Wu y col., eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

20 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de las siguientes figuras, descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Efecto de IBMX sobre la liberación de insulina en páncreas de e21/P0.
- 25 Figura 2: Entrada de calcio estimulada por IBMX en islotes de e21.
- Figura 3A y 3B: PYY induce la maduración de islotes fetales.
- Figura 4: El efecto de PYY sobre islotes de e21 depende del tiempo.
- 30 Figura 5: El efecto de PYY sobre islotes de e21 depende de la dosis.
- Figura 6: Efecto de PYY sobre islotes adultos.
- Figura 7: El efecto de PYY sobre el aumento de la capacidad de respuesta a glucosa requiere la activación de la transcripción de genes.
- 35 Figura 8: El efecto de la actinomicina D no está

mediado por la reducción del contenido de insulina en islotes.

Figura 9: La presencia de PYY no afecta la tasa de secreción basal.

5 Figura 10: Efecto de PYY sobre la restablecimiento de la respuesta a glucosa en islotes de rata adulta.

Descripción detallada de la invención

(i) Visión general de la invención

10 Ahora se han identificado las señales hormonales requeridas y el momento de tiempo en el que tiene lugar la señalización hormonal durante el desarrollo fetal para la maduración de células β del páncreas (es decir, aumento de la capacidad para producir insulina en respuesta a glucosa).
 15 El desarrollo de islotes pancreáticos avanza mediante etapas durante la gestación fetal que son puntuadas por transiciones discretas. El periodo inicial es un estado protodiferenciado que se caracteriza por el compromiso de células madre pluripotentes con el linaje de células de islotes como se ha manifestado por la expresión de insulina y glucagón.
 20

La invención se refiere al descubrimiento de que el tratamiento de islotes fetales con péptido YY (PYY) *in vitro* produjo la maduración de los islotes insensibles a glucosa a islotes maduros que respondieron a glucosa liberando insulina. Significativamente, también se ha mostrado que el PYY restablece la sensibilidad a glucosa en islotes adultos pancreáticos que de otro modo han perdido la capacidad de secretar insulina en respuesta a glucosa (Figura 6). Estos hallazgos indican que los agonistas de PYY pueden usarse para inducir la formación de tejido pancreático sensible a glucosa tanto *ex vivo* como *in vivo* a partir de poblaciones de células progenitoras. Asimismo, los hallazgos perfectos demuestran que los agonistas de PYY pueden usarse para mantener o prolongar de otro modo el tiempo que las células β son sensibles a glucosa, además de restablecer la sensibilidad a glucosa en las células β .
 25
 30
 35

En un aspecto, el presente descubrimiento proporciona reactivos y métodos para generar células sensibles a glucosa a partir de células progenitoras pancreáticas. En otras realizaciones, el método objeto puede usarse para 5 restablecer o mantener la sensibilidad a glucosa en islotes pancreáticos cultivados u otras células pancreáticas, en particular islotes o células pancreáticos que están siendo preparadas para el trasplante en un animal, preferentemente un ser humano. Se describe un método que puede usarse para 10 evitar la pérdida de células pancreáticas sensibles a glucosa *in vivo*.

En general, la invención se refiere a métodos *in vitro* para regular (inducir o mantener) islotes pancreáticos sensibles a glucosa o células β aisladas mediante el uso de 15 un péptido PYY como se define en las reivindicaciones. La administración de un péptido PYY mediante el método objeto puede hacer que las células pancreáticas tratadas adquieran sensibilidad a glucosa, enriqueciéndose así un isloite o población de células β en células β sensibles a glucosa, o 20 inducirán islotes o células que han perdido la capacidad para responder a glucosa para recuperar la sensibilidad a glucosa.

Un péptido PYY puede administrarse *in vivo* a un sujeto en una composición farmacológicamente aceptable o puede 25 administrarse *ex vivo* a islotes o líneas celulares cultivados. En el caso de material de trasplante (es decir, isloite pancreático o células β tratadas con PYY), las células pueden administrarse a un animal con el péptido PYY, sólo o en combinación con otros agentes como se define en 30 las reivindicaciones que pueden potenciar el efecto de un péptido PYY.

El animal o los islotes o células pancreáticos del mismo pueden tratarse con factores que pueden inducir o potenciar la producción por las propias células de islotes 35 de otros factores que pueden potenciar la sensibilidad a glucosa inducida por PYY. Por ejemplo, el gen de insulina contiene múltiples elementos que actúan en *cis* (es decir,

elementos potenciadores y represores sensibles a glucosa) que contribuyen a la actividad basal, especificidad de tejido y respuesta metabólica del promotor de insulina (Sander, M. y col., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11572-77; Odagiri, H. y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:1909-1915). Sander y col. han demostrado que un elemento sensible a glucosa que hace de potenciador en islotes primarios de rata fetal y adulta cultivados hace de represor tanto en células tumorales de células β completamente desarrolladas como en células β de hiperplasia a partir de células hiperplásicas pretumorigénicas (es decir, líneas celulares diferenciadas y desdiferenciadas, respectivamente), sugiriendo diferencias fundamentales en la regulación del gen de insulina entre células β inmortalizadas y células de islotes nativos. Sander y col. encontraron que un complejo sensible a glucosa distinto que se une al elemento potenciador sensible a glucosa se encontró sólo en células de islotes cultivadas y que estas diferencias podrían explicar la ausencia de un represor en células β primarias cultivadas, permitiendo quizás que un activador ubicuo funcione o que un activador que está presente sólo en células de islotes primarias, anule el efecto de un represor ubicuo. Por tanto, los efectos del tratamiento de células β con PYY podrían potenciarse por el tratamiento simultáneo con agentes que alteran los niveles de tales factores (por ejemplo, factores de transcripción) u otros factores que participan en la regulación del gen de insulina en respuesta a glucosa.

Alternativamente, los islotes o células pancreáticos pueden tratarse con factores que pueden producir o potenciar la producción por otros tipos de células de otros factores que pueden potenciar sensibilidad a glucosa inducida por PYY. Por ejemplo, células α , δ o PP pueden estimularse por PYY para producir factores que pueden alterar la expresión génica o el metabolismo de la glucosa en un animal.

Los agonistas de los receptores de PYY también pueden identificarse usando la presente invención. PYY pertenece a

la familia de péptidos llamada la "familia de PP", otros miembros de la cual incluyen NPY y PP. Se han clonado varios subtipos de receptores de la familia de PP. Todos estos contienen varios dominios transmembranarios y pertenecen a la superfamilia acoplada a proteína G de receptores. La familia de receptores de PP incluye Y1-R, Y2-R, Y3-R, Y4-R, Y5-R y Y6-R, diferenciándose cada receptor en las propiedades de unión y distribución de tejido e identidad de secuencias (Jackerott, M. y Larsson, L.I. (1997) *Endocrinol.* 138:5013-18). Y1, Y2, Y5 y Y6, por ejemplo, se unen a fragmentos del extremo C de PYY y NP Y3-36 y PYY3-36. Para una revisión véase Gehlert D.R. (1998) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218(1):7-22. Se han descrito agonistas endógenos de los receptores de PYY que se producen naturalmente (por ejemplo, PYY1-36 y NPY1-36).

Alternativamente, los factores que pueden aumentar la expresión del receptor de PYY en células pancreáticas también pueden administrarse a un sujeto o a islotes o células *ex vivo* para potenciar el efecto de sensibilidad a glucosa de PYY (véase por ejemplo, Holliday, N. D. y Cox, H. M. (1996) *Br. J. Pharmacol.* 119(2):321-9). El aumento de los niveles de receptores de PYY potenciaría adicionalmente el efecto de un agente terapéutico de PYY sobre células β pancreáticas. Además, el número de receptores de PYY en células β pancreáticas puede aumentarse mediante la introducción de vectores recombinantes que comprenden secuencias de ADN que codifican un receptor de PYY. Aunque se prefieren los receptores P2 y P5, pueden inducirse o introducirse P1, P3, P4 y P6 u otro receptor de PYY específico.

Alternativamente, los agentes que pueden potenciar el transporte o la fosforilación de glucosa (por ejemplo, el regulado por la expresión de glucocinasa) pueden administrarse conjuntamente con el agente terapéutico de PYY (véase, por ejemplo, Schuit, F. C. (1996) *Horm. Res.* 46:99-106). Todavía más, se ha encontrado que el nivel de expresión del transportador de glucosa GLUT2 se reduce en

modelos animales de diabetes y la transfección de *GLUT2* en líneas celulares puede conferir sensibilidad a glucosa en las células, o ratones transgénicos con *GLUT2* regulado por disminución en células β o ratas diabéticas (Thorens, B. y col. (1990) *Proc. Acad. Sci., USA* 87: 6492-96; Hughes, S. D. y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:688-92; Valera y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:28543-46; Johnson, D. y col. (1990) *Science* 250:546-49). La introducción de un gen *GLUT-2* en una línea celular ATT-20_{ins} pituitaria no pancreática 5 confirió la liberación de insulina estimulada por glucosa, la potenciación de glucosa de secretagogos de no glucosa y un aumento en el contenido de insulina (Hughes y col., anteriormente) y el restablecimiento de la expresión de *GLUT-2* confiere sensibilidad a glucosa y aumento de la 10 actividad de glucocinasa en células de insulinoma de rata (RIN) (Ferber, S. y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(15):11523-29).

Antes del trasplante, las células de islotes pancreáticos donantes se cultivan, lo que produce la pérdida 15 de su capacidad para secretar insulina en respuesta a glucosa. Los métodos proporcionados en este documento proporcionan medios para mantener las células pancreáticas cultivadas como células β sensibles a glucosa funcionalmente maduras que continúan produciendo insulina. 20 Alternativamente, los cultivos de células pancreáticas que han perdido su sensibilidad a glucosa pueden restablecer células sensibles a glucosa mediante la presente invención.

La invención proporciona usos como se definen en las reivindicaciones para tratar enfermedades asociadas al 25 metabolismo alterado o defectuoso de glucosa, por ejemplo, en enfermedades que se caracterizan por una incapacidad para responder al aumento o la disminución de niveles de glucosa o sus subproductos en la sangre. El descubrimiento de que el PYY potencia o restablece la sensibilidad a glucosa proporciona numerosas estrategias para restablecer o 30 aumentar la producción de insulina en un animal, preferentemente en seres humanos.

En otra realización, los agonistas de PYY pueden identificarse mediante los métodos de la invención mediante comparación de tratamiento de células insensibles a glucosa (por ejemplo, islotes fetales o células β o islotes adultos insensibles o células β con factores de prueba y comparando sus efectos con los efectos provocados con PYY. La invención proporciona métodos para cribar bibliotecas de proteínas, péptidos o ADN para la presencia de un gen que codifica un agonista de PYY según métodos conocidos en la técnica.

También se describe que las enfermedades asociadas al metabolismo alterado de la glucosa pueden tratarse administrando una cantidad farmacéuticamente eficaz de células β pancreáticas tratadas con PYY (que han obtenido sensibilidad a glucosa). Por ejemplo, las células sensibles a glucosa se administran a un animal en una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición de células sensibles a glucosa comprende además otros factores que pueden aumentar la secreción de insulina, tal como un agente terapéutico de PYY.

Alternativamente, la composición puede administrarse conjuntamente tanto simultánea, secuencial como por separado con un inhibidor de proteasa que prolonga la semivida en suero de un agente terapéutico de PYY, por ejemplo, tal como un inhibidor de dipeptidilpeptidasa. En una realización preferida, el inhibidor de dipeptidilpeptidasa es un inhibidor de DPPIV. La composición de células puede administrarse tanto simultánea, secuencial como por separado con los factores adicionales. El método puede usarse para tratar una enfermedad que está asociada a una afección tal como resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa o falta de sensibilidad a la glucosa, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia y hiperlipoproteinemia en un animal.

En una realización preferida, el péptido PYY induce sensibilidad a glucosa en una célula insensible del linaje pancreático. En otra realización preferida, el péptido PYY potencia la sensibilidad a glucosa produciendo la maduración

de células progenitoras pancreáticas. En otra realización preferida, el péptido PYY potencia la sensibilidad a glucosa en una célula β pancreática parcialmente intolerante a glucosa o que expresa baja insulina de un animal posparto. 5 En todavía otra realización preferida, el péptido PYY recupera la sensibilidad a glucosa en células pancreáticas defectuosas de un animal posparto.

En otro aspecto, la invención proporciona células β diferenciadas generadas en cultivo celular poniendo en 10 contacto una célula sin diferenciar de un organismo vertebrado con un péptido PYY. En una realización preferida, la invención proporciona células β pancreáticas que secretan insulina en respuesta a glucosa para uso en trasplante y un vehículo farmacéuticamente aceptablemente adecuado para la 15 administración farmacéutica a un animal, en el que la composición celular puede secretar insulina *in vivo* en respuesta a glucosa.

La memoria descriptiva describe adicionalmente un 20 método para generar conjuntos de mutantes combinatorios de proteínas PYY, además de bibliotecas de mutantes de truncamiento, y es especialmente útil para identificar posibles secuencias variantes (por ejemplo, homólogos o 25 análogos) que son funcionales en la unión a un receptor para proteínas PP y que altera la sensibilidad a glucosa de isletos o células pancreáticos. El fin de cribar tales bibliotecas combinatorias es generar, por ejemplo, novedosos 30 homólogos o análogos de PYY que son tanto agonistas como antagonistas, o alternativamente poseen actividades completamente novedosas. Para ilustrar, los homólogos o 35 análogos de PYY pueden manipularse mediante el presente método para proporcionar una unión más eficaz a un receptor relacionado, todavía conservan al menos una parte de una actividad asociada a PYY. Por tanto, los homólogos combinatoriamente derivados pueden generarse fácilmente para tener un aumento de la potencia con respecto a una forma de la proteína que se produce naturalmente. Asimismo, los homólogos o análogos de PYY pueden generarse mediante la

presente solución combinatoria para hacer de antagonistas porque pueden imitar, por ejemplo, la unión a otros componentes de la matriz extracelular (tales como receptores), todavía no inducen ninguna respuesta biológica, 5 inhibiendo así la acción de agentes terapéuticos de PYY auténticos. Además, la manipulación de ciertos dominios de PYY por el presente método puede proporcionar dominios más adecuados para uso en proteínas de fusión tales como una que incorpora porciones de otras proteínas que se derivan de la 10 matriz extracelular y/o que se unen a los componentes de la matriz extracelular.

En un aspecto de este método, las secuencias de aminoácidos para una población de homólogos, análogos u otras proteínas relacionadas de PYY están alineadas, 15 preferentemente para promover la mayor homología posible. Una población de variantes tal puede incluir, por ejemplo, homólogos de PYY de una o más especies que pueden inducir sensibilidad a glucosa. Los aminoácidos que aparecen en cada 20 posición de las secuencias alineadas se seleccionan para crear un conjunto degenerado de secuencias combinatorias. La biblioteca variegada de variantes de PYY puede generarse mediante mutagénesis combinatoria al nivel de ácidos nucleicos, y está codificado por una biblioteca de genes variegada. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos 25 sintéticos puede ligarse enzimáticamente a secuencias de genes de forma que el conjunto degenerado de posibles secuencias de PYY sea expresables como polipéptidos individuales, o alternativamente como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la 30 expresión en fago) que contiene el conjunto de secuencias de PYY en su interior.

En otra realización más, la invención proporciona un animal vertebrado no humano transgénico en el que las rutas inductivas de PYY están inhibidas en uno o más tejidos de dicho animal mediante la interrupción de un gen que codifica 35 un péptido PYY como se define en las reivindicaciones.

En una realización preferida, las células progenitoras

son inducibles para diferenciarse en células β pancreáticas. Las células β pancreáticas objeto se estimulan para ser sensibles a glucosa y para producir insulina en respuesta a glucosa. Las células β pancreáticas objeto también pueden 5 caracterizarse basándose en marcadores antigénicos específicos u otros marcadores que pueden expresarse sobre la superficie celular, por ejemplo, integrinas, lectinas, gangliósidos o transportadores, o basándose en morfología celular específica. Todas estas técnicas son conocidas y 10 están disponibles para un experto en la materia. Tales células β pancreáticas pueden caracterizarse en ciertas circunstancias por la expresión de uno o más de: factores de transcripción de tipo homeodominio tales como STF-1; gen(es) PAX tal(es) como PAX6; PTF-1; hXBP-1; gen(es) HNF; vilina; 15 tirosina hidroxilasa; insulina; glucagón; y/o neuropéptido Y.

En una realización preferida, el animal objeto de la invención es un mamífero, preferentemente un ser humano.

(ii) Definiciones

20 Por comodidad, aquí se recogen ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

El término "agonista" como se usa en este documento pretende referirse a un agente que regula por incremento 25 (por ejemplo, imita, potencia o intensifica) al menos una bioactividad de PYY. Un agonista de PYY puede ser una proteína PYY natural o derivado de la misma que tiene al menos una bioactividad de una proteína PYY natural o peptidomimético PYY que hace de agonista de (por ejemplo, imita) la actividad de PYY. Un agonista de PYY también puede ser un compuesto que regula por incremento la expresión de 30 un gen PYY o que aumenta al menos una bioactividad de una proteína PYY. Por tanto, un agonista de PYY incluye aquellos agentes que regulan por incremento la producción y/o secreción de insulina en respuesta a glucosa. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta la interacción de 35 un polipéptido PYY con otra molécula, por ejemplo, un

receptor de la familia de PP, o que imita la unión a y la distorsión de un receptor de PYY por PYY nativo. Otro agonista ilustrativo es un compuesto que potencia la unión de un PYY o factor de transcripción del receptor de PYY a la 5 región en la dirección 5' de un PYY o gen de receptor de PYY, o de un factor de transcripción del gen de insulina a la región en la dirección 5' de un gen de insulina, potenciándose así la síntesis de la proteína de insulina. Un agonista también puede ser un compuesto que regula por 10 incremento la expresión de un PYY o gen de insulina o que aumenta la cantidad de PYY o proteína de insulina presente, por ejemplo, aumentando la síntesis de proteínas o disminuyendo la reposición de proteínas. Además, un agonista de PYY puede ser un inhibidor de antagonistas de PYY.

15 Las "células α " se encuentran en los islotes de Langerhans en el páncreas. Las células alfa secretan glucagón, una hormona que tiene efectos opuestos a los de la insulina (aumenta los niveles de glucosa en sangre).

20 El término "nivel de glucosa en sangre" se refiere a la concentración de glucosa en sangre. El nivel normal de glucosa en sangre (euglicemia) es aproximadamente 120 mg/dl. Este valor fluctúa nada menos que 30 mg/dl en no diabéticos.

25 Como se usa en este documento, el término "animal" se refiere a vertebrados, preferentemente mamíferos, y lo más preferentemente a seres humanos. Asimismo, un "paciente" o "sujeto" que va a tratarse mediante el método de la invención puede significar tanto un animal humano como no humano.

30 El término "antagonista" como se usa en este documento pretende referirse a un agente que regula por disminución (por ejemplo, suprime o inhibe) al menos una bioactividad de PYY. Un antagonista de PYY puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína de PYY y otra molécula, por ejemplo, un receptor de PYY. Alternativamente, 35 un antagonista preferido es un compuesto que inhibe o disminuye la unión de un PYY o factor de transcripción del receptor de PYY a la dirección 5' de un PYY o

gen de receptor de PYY, o de un factor de transcripción de gen de insulina a la región en la dirección 5' de un gen de insulina, bloqueando así la síntesis de la proteína de insulina. Un antagonista también puede ser un compuesto que regula por disminución la expresión de un PYY o gen de insulina o que reduce la cantidad de PYY o proteína de insulina presente, por ejemplo, disminuyendo la síntesis de proteínas o aumentando la reposición de proteínas. El antagonista de PYY puede ser una forma negativa dominante de un polipéptido PYY. El antagonista de PYY también puede ser un ácido nucleico que codifica una forma negativa dominante de un polipéptido PYY, un ácido nucleico de sentido contrario de PYY o una ribozima que puede interactuar específicamente con un ARN de PYY. Todavía otros antagonistas de PYY son moléculas que se unen a un polipéptido PYY o su receptor e inhiben su acción. Tales moléculas incluyen péptidos, anticuerpos y moléculas pequeñas.

Los términos "célula β " o "célula β pancreática" son indistintos como se usan en este documento y se refieren a células en los islotes pancreáticos que son de la línea de células que produce insulina en respuesta a glucosa. Las células β se encuentran en los islotes de Langerhans en el páncreas. Las células beta secretan insulina de una forma regulada en respuesta a niveles de glucosa en sangre. En diabetes mellitus de tipo I o dependiente de insulina (IDDM), las células beta se destruyen mediante un método autoinmunitario. Como el cuerpo ya no puede producir insulina endógena, se requieren inyecciones de insulina exógena para mantener los niveles normales de glucosa en sangre.

"Actividad biológica" o "bioactividad" o "actividad" o "función biológica", que se usan indistintamente con los fines en este documento, significa una función efectora o antigénica que es realizada directa o indirectamente por un agente terapéutico de PYY (tanto si está en su conformación nativa como desnaturalizada), o mediante cualquier

subsecuencia del mismo. Las actividades biológicas incluyen unión a un ácido nucleico diana, por ejemplo, una región en la dirección 5' de un gen, que está regulada por un factor de transcripción inducido por PYY. Una bioactividad de PYY 5 puede modularse afectando directamente un polipéptido de PYY. Alternativamente, una bioactividad de PYY puede modularse modulando el nivel de un polipéptido de PYY, tal como modulando la expresión de un gen PYY o modulando la reposición de la proteína de PYY.

10 Como se usa en este documento, el término "composición celular" se refiere a una preparación de células, preparación que puede incluir, además de las células, componentes no celulares tales como medios de cultivo celular, por ejemplo, proteínas, aminoácidos, ácidos 15 nucleicos, nucleótidos, coenzimas, antioxidantes, metales y similares. Además, la composición celular puede tener componentes que no afectan el crecimiento ni viabilidad del componente celular, pero que se usan para proporcionar las células en un formato particular, por ejemplo, como matriz 20 polimérica para encapsulación o una preparación farmacéutica.

El término "medio de cultivo" es reconocido en la materia y se refiere generalmente a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivas. Por 25 consiguiente, un "cultivo de tejido" se refiere al mantenimiento o al crecimiento de tejido, por ejemplo, explantes de primordios de órganos o de un órgano adulto *ex vivo* de manera que se preserve su arquitectura y función. Un "cultivo celular" se refiere a un crecimiento de células *ex vivo* o *in vitro*; aunque las células proliferan, no se organizan en el tejido por sí mismas.

Las preparaciones de cultivo de tejido y de células de los explantes de microórganos objeto y poblaciones de células progenitoras o β amplificadas pueden tomar una variedad de formas. Por ejemplo, un "cultivo en suspensión" 35 se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican mientras que están suspensas en un medio adecuado. Asimismo,

un "cultivo de flujo continuo" se refiere al cultivo de células o explantes ductales en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento celular, por ejemplo, la viabilidad. El término "medios acondicionados" se refiere al 5 sobrenadante, por ejemplo, libre de las células cultivadas/tejido resultantes después de un periodo de tiempo en contacto con las células cultivadas de forma que el medio ha sido alterado para incluir ciertos factores paracrinos y/o autocrinos producidos por las células y 10 secretados en el cultivo.

El término "inhibidor de DPIV" como se denomina en este documento incluye inhibidores de proteasa, preferentemente inhibidores de serina proteasa, tales como ácidos peptidilborónicos (boroProlina), peptidilaldehídos, haluros 15 de peptidilclorometilo y similares.

Por "intensificación de la diferenciación de una célula" se indica el acto de aumentar el grado de adquisición o posesión de una o más características o funciones que se diferencian de las de la célula original 20 (es decir, especialización de células). Esto puede detectarse cribando un cambio en el fenotipo de la célula (por ejemplo, identificando cambios morfológicos en la célula y/o marcadores de superficie sobre la célula).

Por "intensificación de la supervivencia o 25 mantenimiento de una célula" se engloba la etapa de aumentar el grado de posesión de una o más características o funciones que son las mismas que las de la célula original (es decir, mantenimiento del fenotipo de células).

El término "explante" se refiere a una parte de un 30 órgano extirpado del cuerpo y cultivado en un medio artificial.

La afección de "hiperglucemia" (azúcar alta en sangre) es una afección en la que el nivel de glucosa en sangre es demasiado alto. Normalmente, la hiperglucemia se produce 35 cuando el nivel de glucosa en sangre sube por encima de 180 mg/dl. Los síntomas de la hiperglucemia incluyen micción frecuente, sed excesiva y, durante un largo periodo de

tiempo, pérdida de peso.

Por otra parte, "hipoglucemia" (azúcar baja en sangre) es una afección en la que el nivel de glucosa en sangre es demasiado bajo. Normalmente, la hipoglucemia se produce 5 cuando el nivel de glucosa en sangre se encuentra por debajo de 70 mg/dl. Los síntomas de la hipoglucemia incluyen depresión, insensibilidad de las extremidades (especialmente en las manos y los brazos), confusión, temblor o mareo. Como esta afección se produce cuando hay un exceso de insulina 10 con respecto a la cantidad de glucosa disponible, algunas veces se denomina en lo sucesivo una reacción a insulina.

El término "intolerancia a la glucosa" se usa para describir una persona que, cuando se somete a una prueba de tolerancia a la glucosa, tiene un nivel de glucosa en sangre 15 que se encuentra entre el normal y el hiperglucémico. Una persona tal tiene un mayor riesgo de desarrollar diabetes, aunque no se considera que tenga diabetes.

Como se usa en este documento, el término "gen" o "gen recombinante" se refiere a un ácido nucleico que comprende 20 un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la presente invención, que incluye tanto secuencias de exones como (opcionalmente) de intrones. Un "gen recombinante" se refiere a ácido nucleico que codifica tales 25 polipéptidos reguladores que puede incluir optionalmente secuencias de intrones que se derivan ambas de un ADN cromosómico.

Los términos "insensible a glucosa" o "falta de sensibilidad a la glucosa" como se usan en este documento describen tanto la completa incapacidad de células, islotes 30 o animales para responder a un tratamiento con o la administración de glucosa como la disminución de la sensibilidad a glucosa (por ejemplo, por células que no producen niveles suficientes de insulina en respuesta a glucosa o que requieren niveles significativamente mayores 35 de glucosa para responder a niveles normales).

Como se usa en este documento, "ADN heterólogo" o "ácido nucleico heterólogo" incluye ADN que no se produce

naturalmente como parte del genoma en el que está presente o que se encuentra en una localización o localizaciones en el genoma que se diferencia(n) de en la(s) que se produce en la naturaleza. El ADN heterólogo no es endógeno a la célula en la que se introduce, sino que ha sido obtenido a partir de otra célula. General, aunque no necesariamente, tal ADN codifica ARN y proteínas que normalmente no son producidas por la célula en la que se expresa. El ADN heterólogo también puede denominarse en lo sucesivo ADN extraño. 5 Cualquier ADN que un experto en la materia reconocería o consideraría como heterólogo o extraño a la célula en la que se expresa está englobado en este documento por ADN heterólogo. 10

El término "célula comprometida a linaje" se refiere a una célula progenitora que ya no es pluripotente, pero que ha sido inducida para diferenciarse en un tipo de célula específica, por ejemplo, una célula pancreática, hepática o intestinal. 15

Como se usa en este documento, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando corresponda, ácido ribonucleico (ARN). También debería entenderse que el término incluye como equivalentes análogos de tanto ARN como ADN preparado a partir de análogos de nucleótidos y, como 20 puede aplicarse a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tales como de sentido directo o de sentido contrario) y bicatenarios. 25

El término "órgano" se refiere a dos o más capas adyacentes de tejido cuyas capas de tejido mantienen alguna forma de interacción célula-célula y/o célula-matriz para 30 formar una microarquitectura.

El término "páncreas" es reconocido en la técnica y se refiere generalmente a una glándula grande, alargada, racemosa situada transversalmente detrás del estómago, entre 35 el bazo y el duodeno. La función exocrina pancreática, por ejemplo, secreción externa, proporciona una fuente de enzimas digestivas. De hecho, la "pancreatina" se refiere a

una sustancia del páncreas que contienen enzimas, principalmente amilasa, proteasa y lipasa, sustancia que se usa como ayuda digestiva. La porción exocrina está compuesta por varias células serosas que rodean una luz. Estas células 5 sintetizan y secretan enzimas digestivas tales como tripsinógeno, quimotripsinógeno, carboxipeptidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, triacilglicerol lipasa, fosfolipasa A₂, elastasa y amilasa.

El término "célula pancreática" se refiere a una célula 10 que puede producir una hormona o enzima normalmente producida por una célula pancreática, por ejemplo, al menos célula α , β , δ o PP parcialmente diferenciadas, y una célula, por ejemplo, una célula precursora pancreática, que puede desarrollarse en una célula que puede producir una 15 hormona o enzima normalmente producida por una célula pancreática. En una realización, las células pancreáticas se caracterizan por la capacidad para producir glucagón y/o somatostatina. Las células pancreáticas de la invención también pueden cultivarse antes de la administración a un 20 sujeto en condiciones que promueven la proliferación y la diferenciación celular. Estas condiciones incluyen cultivar las células para permitir la proliferación y la confluencia *in vitro*, momento en el cual las células forman agregados o agrupaciones similares a pseudo-islotes y secretan insulina, 25 glucagón y somatostatina.

El término "célula endocrina pancreática" se refiere a células pancreáticas (por ejemplo, células α , β , δ o PP) que secretan hormona(s) pancreática(s). Por ejemplo, una célula endocrina pancreática de la invención puede ser una célula β fetal o una célula β posparto que ha sido tratada con PYY 30 para producir insulina en respuesta a glucosa.

El término "célula progenitora pancreática" se refiere a una célula que puede diferenciarse en una célula de linaje pancreático, por ejemplo, una célula que puede producir una hormona o enzima normalmente producida por una célula pancreática. Por ejemplo, una célula progenitora pancreática puede producirse para diferenciarse, al menos parcialmente,

en célula α , β , δ o φ , o una célula de destino exocrino. Las células progenitoras pancreáticas también pueden cultivarse antes de la administración a un sujeto en condiciones que promuevan la proliferación y la diferenciación celular.

5 Estas condiciones incluyen cultivar las células para permitir la proliferación y confluencia *in vitro*, momento en el cual las células pueden prepararse para formar agregados o agrupaciones similares a pseudo-islotes y secretan insulina, glucagón y somatostatina. Los métodos de medición

10 de la proliferación celular son muy conocidos en la técnica y más comúnmente incluyen determinar la síntesis de ADN característica de la replicación de células. Hay numerosos métodos en la materia para medir la síntesis de ADN, cualquiera de los cuales puede usarse según la invención. En

15 una realización de la invención, la síntesis de ADN se ha determinado usando una marca radiactiva (^3H -timidina) o análogos de nucleótidos marcados (BrdU) para la detección por inmunofluorescencia. Sin embargo, además de medir la síntesis de ADN y ARN, la secreción de insulina puede

20 basarse, y preferentemente se basará, en la caracterización de poblaciones de células fetales o progenitoras sensibles.

Las células progenitoras se caracterizan por una capacidad de autorregeneración en un medio de cultivo y diferenciación en linajes pancreáticos. Por ejemplo, las

25 células progenitoras pueden aislararse de explantes de conductos intralobulares pancreáticos, por ejemplo, aislados por biopsia, o son la progenie del cultivo celular de tales células. Las células progenitoras son inducibles para diferenciarse en células de isletos pancreáticos, por ejemplo, células β de isletos, células α de isletos, células δ de isletos o células φ de isletos. Tales células progenitoras pancreáticas pueden caracterizarse en ciertas circunstancias por la expresión de uno o más de: factores de transcripción de tipo homeodominio tales como STF-1; gen(es) PAX tal(es) como PAX6; PTF-1; hXBP-1; genes(s) HNF; vilina; tirosina hidroxilasa; insulina; glucagón; y/o neuropéptido Y. Las células progenitoras preferidas serán de origen

mamífero, por ejemplo, células aisladas de un primate tal como un ser humano, de un cerdo miniatura o de un mamífero transgénico, o son la progenie del cultivo celular de tales células. El tejido ductal pancreático puede aislarse de un 5 paciente y someterse al presente método con el fin de proporcionar un cultivo de células progenitoras pancreáticas resultantes (o células diferenciadas derivadas del mismo). La sustitución de genes u otra terapia génica se lleva a cabo *ex vivo*, y las células aisladas se trasplantan de nuevo 10 en el paciente donante inicial o en un segundo paciente hospedador.

En general, puede usarse un sistema de cultivo que permite la expansión reproducible de epitelio ductal pancreático a la vez que se mantiene la "ausencia de linaje" 15 y la capacidad para diferenciarse en células endocrinas y exocrinas. El epitelio ductal pancreático se obtiene, por ejemplo, por explante o digestión enzimática y se cultiva hasta confluencia. La población de células confluentes se pone en contacto con un agente, por ejemplo, un agente 20 trófico tal como un factor de crecimiento que produce diferenciación de células progenitoras en la población cultivada. Posteriormente se aislan las células progenitoras del explante que proliferan en respuesta al agente tal como 25 por separación mecánica directa de brotes nuevamente emergentes a partir del resto del explante o por disolución de todo o una parte del explante y posterior aislamiento de la población de células progenitoras. El agente puede ser Forskolin, dibutil-cAMP, butirato de Na, dexametasona o la toxina del cólera o puede ser un factor de crecimiento tal 30 como IGF, TGF, FGF, EGF, HGF, hedgehog o VEGF u otro miembro de la superfamilia de TGF β , preferentemente de la familia de DVR (dpp y vgl relacionados), por ejemplo, BMP2 y/o BMP7. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se 35 refiere a la progenie de las células progenitoras objeto, por ejemplo, aquellas células que se han derivado de las células del cultivo de explante inicial. Tal progenie puede incluir generaciones posteriores de células progenitoras,

además de células comprometidas con linaje generadas induciendo diferenciación de las células progenitoras objeto después de su aislamiento a partir del explante, por ejemplo, inducido *in vitro*.

5 A modo de ejemplo, en el expediente del apoderado de la solicitud de patente provisional de EE.UU. número ONV-060.60 se proporcionan células progenitoras viables y métodos para aislar tales células a partir de tejidos ductales pancreáticos. Brevemente, conductos pequeños de páncreas de 10 rata se aislan después de la digestión enzimática en colagenasa A o colagenasa H (Boehringer-Mannheim), se lavan y se resuspenden en HBSS (libre de Ca/Mg) y se vierten a través de una malla de 500u para eliminar partículas grandes y se lavan de nuevo. Para animales mayores (más de 2 15 semanas), el digesto se resuspende en HBSS y se coloca en una placa de 100 mm. Los fragmentos de conductos en flotación se aislan manualmente con una pipeta. Para mayores rendimientos, páncreas de crías de rata de 2 semanas pueden separarse en Percoll (Pharmacia). Los páncreas digeridos se 20 recubren en una disolución de Percoll al 40% y se centrifugan a 1900 rpm/10 min. Los fragmentos de conductos se localizan en la superficie de separación del tampón y Percoll en la parte superior del tubo. Este material se lava y se coloca en una placa de 100 mm. Los islotes 25 contaminantes (muy pocos) se eliminan manualmente. Los fragmentos (incluyendo células individuales) se lavan de nuevo y se siembran en placa para el cultivo. Los fragmentos de conductos se cultivan preferencialmente en DMEM modificado con Iscoves con SBF al 5% y penicilina/estreptomicina. Idealmente, las células se 30 cultivan durante 5 días para lograr una monocapa confluente que entonces puede inducirse para diferenciarse. La confluencia de toda la monocapa no es esencial, la diferenciación puede tener lugar en cualquier parche de células confluentes. La monocapa puede cultivarse en 35 presencia de EGF (10 ng/ml) o TGF- α (10 ng/ml) para potenciar el crecimiento. Se cree que la inducción de

diferenciación depende de cAMP. Se prevé que los agentes que inducen un aumento en los niveles de cAMP intracelular induzcan diferenciación. Se han probado dexametasona, toxina del cólera, Forskolin, dibutil-cAMP y butirato de Na y se encuentra que inducen diferenciación. La inducción de la diferenciación se hace preferencialmente en un único tratamiento durante 48 h. Las células progenitoras aparecen durante el transcurso de del tratamiento de 48 h. El tratamiento también puede hacerse durante 24 h, produciendo 10 células progenitoras.

El término "idéntico en porcentaje" se refiere a la identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Cada identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que 15 puede alinearse para fines de comparación. Si una posición equivalente en las secuencias comparadas es ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; si el sitio equivalente es ocupado por el mismo residuo de aminoácido o uno similar 20 (por ejemplo, similar en naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse en lo sucesivo homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos 25 idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden usarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento que incluyen FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias de GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y puede usarse, por ejemplo, con 30 parámetros por defecto. ENTREZ está disponible del Centro nacional para información biotecnológica, Biblioteca nacional de medicina, Instituto nacional de salud, Bethesda, Md. En una realización, la identidad en porcentaje de dos secuencias puede determinarse por el programa GCG con un 35 peso de hueco de 1, por ejemplo, cada hueco de aminoácido se pesa como si fuera un único desapareamiento de aminoácidos o

de nucleótidos entre las dos secuencias.

Como se usa en este documento, "fenotipo" se refiere a todas las representaciones físicas, bioquímicas y fisiológicas de una célula, por ejemplo, que tienen una 5 característica cualquiera o cualquier grupo de características.

El término "célula progenitora" se refiere a una célula sin diferenciar que puede proliferar y dar lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar un 10 gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hija diferenciadas o diferenciables. Como se usa en este documento, el término "célula progenitora" también pretende englobar una célula que algunas veces se denomina en la materia como una "citoblasto". En una realización 15 preferida, el término "célula progenitora" se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, frecuentemente en diferentes direcciones, por diferenciación, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales como se produce en la diversificación progresiva de células y tejidos 20 embrionarios.

El término "sujeto" pretende incluir mamíferos, particularmente seres humanos, susceptibles a enfermedades caracterizadas por actividad de insulina insuficiente.

Como se usa en este documento, el término 25 "sustancialmente puras", con respecto a células progenitoras, se refiere a una población de células progenitoras que tiene al menos aproximadamente el 75%, preferentemente al menos aproximadamente el 85%, más 30 preferentemente al menos aproximadamente el 90% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de pureza con respecto a células progenitoras que representan una población de células total. Reestructurando, el término "sustancialmente puras" se refiere a una población de células progenitoras de la presente invención que contiene 35 menos de aproximadamente el 20%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, lo más preferentemente menos de

aproximadamente el 5% de células comprometidas con linaje en la población sin amplificar y aislada original antes del posterior cultivo y amplificación.

5 El término "tejido" se refiere a un grupo o capa de células similarmente especializadas que juntas realizan ciertas funciones especiales.

10 El término "trasplante" como se usa en este documento pretende incluir células, tejidos o dispositivos que se introducen en un animal y pueden ser alógenos, autólogos o xenógenos.

15 La "secuencia reguladora de la transcripción" es un término genérico usado en toda la memoria descriptiva para referirse a secuencias de ADN tales como señales de iniciación, potenciadores y promotores que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de 20 proteínas a las que están operativamente ligadas. En realizaciones preferidas, la transcripción de un gen recombinante está bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora de la transcripción) que 25 controla la expresión del gen recombinante en un tipo de célula en la que se pretende la expresión. También se entenderá que el gen recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras de la transcripción que son iguales o que son diferentes de aquellas secuencias que controlan la transcripción de la forma de la proteína que se produce naturalmente.

30 Como se usa en este documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector preferido es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y expresión 35 autónoma de los ácidos nucleicos a los que están ligados. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados se denominan en este documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante

están frecuentemente en forma de "plásmidos" que se refieren a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente 5 ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales que cumplen funciones equivalentes y que se conocen en la técnica posteriormente a esto.

10 Términos adicionales se definen cuando corresponda más adelante.

(iii) *Péptidos PYY y agonistas de PYY a modo de ejemplo*

El PYY es la hormona predominante de la familia de los polipéptidos pancreáticos en páncreas de ratón y rata en 15 desarrollo. Es un miembro de la familia PP de proteínas que también incluye neuropéptido Y (NPY) y polipéptido pancreático (PP). La secuencia para el PYY humano se facilita por YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHILNLVTRQRY (SEQ ID No: 3).

20 El PYY inhibe la motilidad intestinal y el flujo de sangre mesentérico al tracto gastrointestinal y al páncreas, media en la secreción exocrina gástrica, pancreática e intestinal y estimula la absorción neta (véase, por ejemplo, Laburthe (1990) *Trends Endocrinol. Metabol.* 1:168; Lundberg, 25 J.M. y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4471-75; Suzuki, T. (1983) *Gastroenterology* 85:114-21; Pappas, T.N. (1985) *Am. J. Physiol.* 248:G118-G123; Cox y col. (1990) *Br. J. Pharmacol.* 101:247; Playford y col. (1990) *Cancer* 335:1555; McFayden y col. (1986) *Neuropeptides* 7:219). 30 También se ha mostrado que PYY inhibe la liberación de CCK, insulina y glucagón en diversos animales (Lluis, F y col. (1988) *Gastroenterology* 94:137-44; Guo, Y.S. y col. (1988) *Pancreas* 3:128-34; Böttcher, G. y col. (1989) *Pancreas* 4:282-88; Guo, Y. S y col. (1989) *Gastroenterology* 96:690-35 94; Greeley y col. (1988) *Am. J. Physiol.* 254:E513-17). El ARNm de PYY se ha detectado en e15 en células endocrinas pancreáticas de rata y en e10,5 de ratón con niveles de ARNm

de PYY pico que se producen en la gestación tardía y que permanecen a niveles más bajos en ratas adultas (Krasinski, S. y col. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5:433-40; Upchurch, B.H. (1994) *Development* 120:245-52). Las células de PYY aparecen 5 más temprano y son más numerosas que las células de NPY y PP, sugiriendo que PYY es la hormona pancreática que se expresa más pronto (Jackerott, M. (1996) *J. Histochem. and Cytochem.* 44(8):809-17. En ratón, el PYY se expresa en todos los tipos de células de islotes durante el desarrollo, 10 sugiriendo que los cuatro tipos principales de células se producen a partir de una célula progenitora multihormonal productora de PYY común. (Myrsén-Axcrona, anteriormente; Upchurch y col., anteriormente). Por ejemplo, el PYY, la insulina y el glucagón están presentes en las mismas células 15 de islotes en etapas embrionarias tempranas (e12-e15), pero se limita a células no β de islotes (principalmente células que contienen glucagón) después de la formación de poblaciones separadas de células que contienen insulina y glucagón (e16-P0). (Myrsén-Axcrona y col., anteriormente). 20 Estos hallazgos sugieren que las células que contienen insulina se diferencian de las células que coexpresan glucagón y PYY. (Myrsén-Axcrona y col., anteriormente).

Los métodos objeto pueden llevarse a cabo usando péptido YY purificado nativo o péptido YY recombinante, o 25 fragmentos de los mismos, además de peptidomiméticos de los mismos. El péptido tirosina-tirosina o péptido YY ("PYY") es un péptido de 36 restos de aminoácidos aislado originalmente de intestino porcino y localizado principalmente en las células endocrinas de la mucosa del intestino distal, y 30 también producido en el intestino proximal y el páncreas (Tatemoto y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2514; Aponte, G. W. y col. (1989) *FASEB J.* 3:1949-55). Los homólogos y análogos de PYY pueden generarse por mutagénesis, tal como por mutación (mutaciones) puntual(es) 35 discreta(s), o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a homólogos que conservan sustancialmente la misma actividad biológica de PYY, o simplemente un

subconjunto. Alternativamente pueden generarse formas antagonistas de la proteína que pueden inhibir la función de la forma de PYY que se produce naturalmente, tal como uniéndose competitivamente a un receptor relacionado de PYY, 5 bloqueándose así la transducción de señales. Además, pueden generarse formas agonistas de PYY que son constitutivamente activas. Por tanto, el PYY y los homólogos del mismo pueden ser reguladores tanto positivos como negativos de la capacidad de respuesta a glucosa en islotes o células β 10 pancreáticos.

El PYY humano y los fragmentos del mismo pueden comprarse comercialmente (catálogo de Bachem California 1993-1994, Torrance, Calif.; catálogo de 1994 de péptidos y aminoácidos de Sigma, St. Louis, Miss.). Los análogos y 15 miméticos de PYY también pueden sintetizarse por muchas técnicas que son conocidas para aquellos expertos en la técnica de los péptidos. Un resumen de las muchas técnicas disponibles puede encontrarse en Solid Phase Peptide Synthesis 2^a ed. (Stewart, J.M. y Young, J.D., Pierce 20 Chemical Company, Rockford, Il.. 1984). Otros análogos de PYY pueden prepararse haciendo modificaciones apropiadas, dentro de la capacidad de una persona experta en la materia.

En general, los polipéptidos citados en este documento que tienen una actividad (por ejemplo, son "bioactivos") de 25 PYY se definen como polipéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos correspondiente (por ejemplo, idéntica u homóloga) a toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de PYY y que imita o antagoniza toda o una parte de las actividades biológicas/bioquímicas de una proteína de PYY 30 que se produce naturalmente. Tal actividad biológica incluye la inducción o potenciación de la capacidad de respuesta a glucosa como se demuestra por la inducción o el aumento de la producción de insulina y otros indicios de diferenciación de células β tales como, por ejemplo, factores de transcripción de tipo homeodominio tales como STF-1; gen(es) 35 PAX tal(es) como PAX6; PTF-1; hXBP-1; gen(es) HNF; vilina; tirosina hidroxilasa; insulina; glucagón; y/o neuropéptido

Y.

La bioactividad de un análogo de PYY también puede incluir la capacidad de alterar la tasa de transcripción de un gen como, por ejemplo, un componente en la dirección 3' 5 de una cascada de transducción de señales iniciada por la interacción de un análogo de PYY con su receptor relacionado.

Otras actividades biológicas de agentes terapéuticos de PYY se describen en este documento o serán razonablemente 10 evidentes para aquellos expertos en la materia.

Un polipéptido PYY que representa una parte del polipéptido de longitud completa puede ser tanto un agonista (por ejemplo, imita o potencia) como alternativamente un antagonista de una actividad biológica de una forma de la 15 proteína que se produce naturalmente, por ejemplo, el polipéptido puede modular diferenciación y/o sensibilidad a glucosa para proteínas PYY auténticas. Los homólogos de las proteínas PYY objeto incluyen versiones de la proteína que son resistentes a escisión proteolítica como, por ejemplo, 20 debido a mutaciones que alteran las posibles secuencias de escisión o que inactivan una actividad enzimática asociada a la proteína.

Los polipéptidos PYY de la presente invención que representan porciones de los polipéptidos de longitud completa pueden estar glicosilados o, por el contrario, mediante la elección del sistema de expresión o mediante modificación de la secuencia de proteínas para excluir glicosilación, también pueden proporcionarse análogos de carbohidratos reducidos. Las formas glicosiladas incluyen 25 30 derivatización con cadenas de glicosaminoglicano.

Las proteínas objeto también pueden proporcionarse como moléculas quiméricas tales como en forma de proteínas de fusión. Por ejemplo, la proteína PYY puede proporcionarse como una proteína de fusión recombinante que incluye una 35 segunda porción de polipéptido, por ejemplo, un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sin relacionar con PYY, por ejemplo, la segunda porción de

polipéptido es glutatión-S-transferasa, por ejemplo, la segunda porción de polipéptido es una actividad enzimática tal como fosfatasa alcalina, por ejemplo, la segunda porción de polipéptido es una marca de epítopo.

5 Se ha informado de análogos de PYY que emulan y potencian la duración, efecto, actividad biológica y selectividad del péptido natural en el tratamiento de tumores pancreáticos (véase el documento USSN 5.574.010).

10 (iv) *Usos a modo de ejemplo de agentes terapéuticos de PYY*

15 En un aspecto, la presente invención proporciona los usos terapéuticos de los cultivos celulares pancreáticos de la presente invención. Por ejemplo, se describe un método de alteración de los niveles de azúcar en sangre que comprende administrar a un animal un cultivo celular de células endocrinas pancreáticas que han sido generadas por el presente método. El cultivo celular usado para alterar los niveles de azúcar en sangre puede ser un cultivo celular primario de células endocrinas pancreáticas o un cultivo de pases en serie del mismo. Las células endocrinas pancreáticas cultivadas de la presente invención incluyen células β que secretan insulina en respuesta a concentración de glucosa.

20 En este documento también se describe un método que utiliza una población aislada de células pancreáticas obtenidas a partir de un embrión (de un mamífero no humano que ha sido "humanizado") en una etapa de desarrollo de aproximadamente el equivalente del día e21 de gestación. Pueden cultivarse células pancreáticas obtenidas a partir de embriones, por ejemplo, como una monocapa de células secretoras de no insulina adherentes en presencia de un agente terapéutico de PYY. Si se deja que estas células alcancen la confluencia, forman agregados o agrupaciones similares a islotes y empiezan a secretar hormonas pancreáticas tales como insulina, glucagón y somatostatina, 25 y enzimas. En este momento, tales agregados pueden aislarse, reunirse y administrarse a un sujeto receptor en el que secretan insulina. Pueden usarse aproximadamente 100.000 a

500.000 agregados, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 300 a 500 células para tratar un ser humano. En seres humanos, se ha demostrado que fetos de 6-12 semanas no responden a glucosa, pero pueden inducirse para que 5 produzcan insulina en un modo monofásico entre 17 y 20 semanas, pero que esta respuesta es débil (1,6 veces). La secreción bifásica de insulina se logra después del nacimiento, entre 26 y 44 semanas (Otonkoski T y col. *Diabetes* 1988 Mar 37(3):286-91). Esto sugiere que el 10 páncreas fetal humano ya es sensible a glucosa durante la primera mitad de la gestación, pero la liberación de insulina bifásica no empieza a madurar hasta la fase postnatal. El método de alterar los niveles de azúcar en sangre también puede llevarse a cabo usando células 15 endocrinas pancreáticas cultivadas en una forma similar a tejido. Tales células endocrinas pancreáticas cultivadas, tanto como células β individuales como en combinación con otros tipos de células, pueden formar espontáneamente agregados coherentes o mediante técnicas de cultivo 20 conocidas en la técnica. Tales agregados coherentes se denominan "pseudoislotes" en este documento. Preferentemente, los pseudoislotes se incorporan en una matriz biocompatible adecuada tal como colágeno usando métodos conocidos en la técnica. Las células endocrinas 25 pancreáticas cultivadas también pueden formarse en agregados coherentes mediante incubación simultánea con un material biocompatible adecuado tal como colágeno, por lo que las células están en forma de suspensiones libres antes de la incubación simultánea. El agregado coherente de células 30 formadas por cualquier método se llama un "pseudotejido". Los pseudotejidos forman un injerto biológicamente compatible que puede implantarse en un mamífero, y en ellos funcionan para alterar niveles de azúcar en sangre.

35 Los cultivos primarios, secundarios y posteriores o clónicos de células endocrinas pancreáticas, o combinaciones de las mismas, preparados según los métodos descritos en este documento y ejemplificados más adelante pueden usarse

en tales pseudotejidos. El método implica injertar células endocrinas pancreáticas como un pseudotejido, por ejemplo, en un mamífero en el que el pseudotejido se vasculariza y responde a los niveles de glucosa en sangre en el mamífero 5 hospedador secretando insulina cuando los niveles de glucosa en sangre alcanzan un nivel suficientemente alto. La vascularización del pseudotejido parece ser importante porque en aquellos experimentos en los que el pseudotejido no se vascularizó, los niveles de azúcar en sangre no se 10 regularon. Similarmente, la vascularización retardada de un pseudotejido pareció afectar la capacidad del pseudotejido para regular niveles de azúcar en sangre.

También se ha descrito en este documento un método para proporcionar una capacidad secretora de insulina sensible a 15 glucosa a un mamífero en necesidad de tal capacidad. El método incluye generalmente implantar células manipuladas que secretan insulina en respuesta a glucosa en un mamífero tal. El inventor ha propuesto que las técnicas actualmente en uso para la implantación de islotes se aplicarán a la 20 implantación de células manipuladas según la presente invención. Un método implica la encapsulación de células manipuladas en un recubrimiento biocompatible. En esta solución, las células están atrapadas en un recubrimiento capsular que protege las células encapsuladas de respuestas 25 inmunológicas, y también sirve para evitar la proliferación incontrolada de células manipuladas clónicas. Una técnica de encapsulación preferida implica la encapsulación con alginato-polilisina-alginato. Las cápsulas preparadas empleando esta técnica contienen generalmente varios cientos 30 de células y tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm.

Una solución alternativa es sembrar fibras Amicon con células manipuladas. Las células se enredan en las fibras, que son semipermeables, y, por tanto, se protege de un modo similar a los microencapsulados (Altman y col., 1986).

35 Después de la encapsulación satisfactoria o siembra de fibra, las células, generalmente aproximadamente 1.000-10.000, pueden implantarse intraperitonealmente, normalmente

mediante inyección en la cavidad peritoneal a través de una aguja de calibre grande (23 de calibre).

Una variedad de otras tecnologías de encapsulación que se han desarrollado que han sido propuestas por el presente inventor se aplicarán a la práctica de la presente invención (véase, por ejemplo, Lacy y col. (1991) *Science* 254:1782-84, y Sullivan y col. (1991) *Science* 252:718-21; documentos WO 9110470; WO 9110425; WO 9015637; WO 9002580; la patente de EE.UU. nº 5.011.472; la patente de EE.UU. nº 4.891.538; documento WO 8901967). La empresa Cytotherapeutics ha desarrollado tecnologías de encapsulación que ahora están comercialmente disponibles que probablemente serán útiles en la aplicación de la presente invención. También se ha desarrollado un dispositivo vascular por Biohybrid, de Shrewsbury, Mass., que puede tener aplicación para la tecnología de la presente invención.

Con respecto a los métodos de implantación que pueden emplearse para proporcionar una capacidad secretora de insulina sensible a glucosa para un mamífero, se contempla que pueden encontrarse ventajas particulares en los métodos recientemente descritos por Lacy y col., anteriormente; Sullivan y col., anteriormente. Estos se refieren, en primer lugar, al xenoinjerto subcutáneo de islotes encapsulados; y en segundo lugar, a la implantación a largo plazo de tejido de islotes en un "páncreas artificial" que puede conectarse al sistema vascular como una derivación arteriovenosa. Estos métodos de implantación pueden adaptarse ventajosamente para uso con la presente invención empleando células manipuladas como se ha desvelado en este documento en el sitio del "tejido de islotes" de los métodos de la técnica anterior.

En este documento se describen adicionalmente métodos de uso de las células manipuladas de la presente invención en la producción de insulina, y particularmente en la producción de insulina humana que puede usarse en el tratamiento de IDDM. Las células β artificiales manipuladas se cultivan en cultivo y luego se ponen en contacto con un tampón que contiene glucosa, estimulándose así las células

para producir y secretar insulina que puede recogerse y purificarse del medio circundante. Se contemplan que las células manipuladas CTG-6 son de uso particular, pero puede emplearse cualquier célula preparada para secretar insulina 5 en respuesta a glucosa. Además, en este documento se describen métodos para tratar enfermedades u otros trastornos caracterizados por una actividad insuficiente de insulina en un sujeto, particularmente un sujeto humano. Estos métodos incluyen administrar a un sujeto un agente 10 farmacéutico de PYY y una población aislada de células pancreáticas que incluyen células productoras de insulina (por ejemplo, células β) o que tienen la capacidad de diferenciarse para formar células secretoras de insulina después de la administración al sujeto. Los términos 15 "introducción", "administración" y "trasplante" se usan indistintamente en este documento para referirse a la administración de células a un sujeto mediante un método o vía que administra las células a una localización deseada. El término "tratar" como se usa en este documento incluye 20 reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma, por ejemplo, deficiencia absoluta o relativa de insulina, hiperglucemia en ayunas, glucosuria, desarrollo de aterosclerosis, microangiopatía, nefropatía y neuropatía, de enfermedades caracterizadas por actividad insuficiente de 25 insulina. Como se usa en este documento, la frase "enfermedades caracterizadas por actividad insuficiente de insulina" incluye enfermedades en las que hay una utilización anormal de la glucosa debido a la función anormal de la insulina. La función anormal de la insulina 30 incluye cualquier anomalía o alteración en la producción de insulina, por ejemplo, expresión y/o transporte por los orgánulos celulares tales como deficiencia de insulina resultante de, por ejemplo, pérdida de células como en IDDM (diabetes de tipo I), secreción tal como alteración de respuestas secretoras de insulina como en NIDDM (diabetes de 35 tipo II), forma de la propia molécula de insulina, por ejemplo, estructura primaria, secundaria o terciaria,

efectos de la insulina sobre las células diana, por ejemplo, resistencia a insulina en tejidos corporales, por ejemplo, tejidos periféricos, y respuestas de células diana a insulina. Véanse Braunwald, E. y col. eds. (1987) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, undécima edición, McGraw-Hill Book Company, Nueva York, pág. 1778-97; Robbins, S. L. y col. (1984) *Pathologic Basis of Disease*, 3^a edición, W. B. Saunders Company, Filadelfia, pág. 972 para más descripciones de actividad anormal de insulina en IDDM y 10 NIDDM y otras formas de diabetes.

Hay diversas soluciones farmacológicas para mejorar la homeostasis de la glucosa, pero aquellas actualmente usadas en la práctica clínica o no tienen éxito en restablecer la normoglucometria en la mayoría de los pacientes o fracasan 15 después de un periodo de tiempo variable (Schein, A.J. (1997) *Drugs* 54(3):355-68). Actualmente se usan cuatro clases de fármacos. Sulfonilureas, biguanidas (metformina), inhibidores de alfa-glucosidasa (acarbosa) e insulina. Puede requerirse terapia con insulina, especialmente en las etapas 20 tardías de la enfermedad para producir el control de hiperglucemias en un intento por minimizar las complicaciones de la enfermedad. El tratamiento más eficaz de la diabetes de tipo II ha sido el inhibidor de alfa-glucosidasa, acarbosa, que reduce los niveles de glucosa posprandial 25 retardando la digestión de hidratos de carbono complejos en el intestino. Otros fármacos metabólicamente activos han demostrado ser demasiado tóxicos. Alternativamente, las sulfonilureas reducen la hiperglucemias aumentando la secreción de insulina y potenciando la acción de la insulina 30 sobre el hígado y los tejidos periféricos. Fármacos tales como las tiazolidin-dionas (por ejemplo, troglitazona, pioglitazona, darglitazona y YM268) potencian la acción de la insulina (es decir, son "sensibilizantes a la insulina").

Alternativamente, aunque es posible trasplantar el 35 páncreas humano, la falta de donantes y los problemas del rechazo inmunitario limitan este método a pacientes seleccionados. El trasplante de células β ha sido realizado

satisfactoriamente en seres humanos, pero el gran número de células β requeridas y el rechazo inmunitario han sido obstáculos. Por tanto, se carece de tratamientos eficaces y económicos.

5 Las células pancreáticas se administran al sujeto mediante cualquier vía apropiada que produzca la administración de las células a una localización deseada en el sujeto en la que las células pueden proliferar y secretar una hormona pancreática, por ejemplo, insulina, o enzima.
10 Las localizaciones preferidas para la administración de células pancreáticas incluyen aquellas que vascularizan rápidamente. Los métodos comunes de administración de células pancreáticas a sujetos, particularmente sujetos humanos, incluyen implantación de células en una bolsa del
15 omento (Yoneda, K. y col. (1989) *Diabetes* 38 (Suppl. 1); 213-216), inyección intraperitoneal de las células, (Wahoff, D. C. y col. (1994) *Transplant. Proc.* 26:804), implantación de las células bajo la cápsula renal del sujeto (véanse, por ejemplo, Liu, X. y col. (1991) *Diabetes* 40:858-866;
20 Korsgren, O. y col. (1988) *Transplantation* 45(3):509-514; Simeonovic, D. J. y col. (1982) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60:383) e inyección intravenosa de las células en, por ejemplo, la vena porta (Braesch, M. K. y col. (1992) *Transplant. Proc.* 24(2):679-680; Groth, C. G. y col. (1992)
25 *Transplant. Proc.* 24(3):972-973). Para facilitar el trasplante de las células pancreáticas bajo la cápsula renal, las células pueden incorporarse en un coágulo de plasma preparado a partir de, por ejemplo, plasma del sujeto receptor (Simeonovic, D. J. y col. (1982) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60:383) o una matriz de colágeno. Las células pueden administrarse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

(v) *Preparaciones farmacéuticas*

35 Aunque es posible administrar PYY o un agonista de PYY o composiciones celulares como compuestos/composiciones puros o sustancialmente puros, se prefiere que se administren como formulaciones o preparaciones

farmacéuticas. Las formulaciones que van a usarse en la presente invención, tanto para seres humanos como animales, incluyen PYY junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para el mismo, y opcionalmente otros componentes terapéuticos.

5 El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el (los) principio(s) activo(s) de formulación (y preferentemente capaz de estabilizar péptidos) y no perjudicial para el sujeto que va a tratarse.

10 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el (los) principio(s) activo(s) al vehículo que constituye uno 15 o más componentes auxiliares.

Se describen composiciones farmacéuticas de agentes terapéuticos de PYY o composiciones celulares, y sus usos en el tratamiento de y/o la prevención de trastornos que pueden mejorarse alterando la homeostasis de hormonas de péptidos. 20 Los inhibidores pueden tener actividades hipoglucémicas y antidiabéticas y pueden usarse en el tratamiento de trastornos marcados por metabolismo anómalo de glucosa que incluye almacenamiento de glucosa. Las composiciones de los métodos objeto pueden ser útiles como agentes 25 insulinotrópicos o para potenciar los efectos insulinotrópicos de tales moléculas como GLP-1. A este respecto, la presente invención es útil para el tratamiento y/o la profilaxis de uno o más de: hiperlipemia, hiperglucemia, obesidad, intolerancia a la glucosa, 30 resistencia a insulina y complicaciones diabéticas.

Los péptidos PYY pueden administrarse en diversas formas dependiendo del trastorno que va a tratarse y la edad, afección y peso corporal del paciente, como es muy conocido en la técnica. Por ejemplo, si los compuestos van a administrarse por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes; o para administración parenteral pueden formularse como inyecciones 35

(intravenosas, intramusculares o subcutáneas), preparaciones de infusión por goteo o supositorios. Para la aplicación por la vía de la membrana mucosa oftálmica pueden formularse como colirios o pomadas oftálmicas. Estas formulaciones 5 pueden prepararse mediante medios convencionales y, si se desea, el principio activo puede mezclarse con cualquier aditivo convencional tal como un excipiente, un aglutinante, un agente de disgregación, un lubricante, un corrector, un agente solubilizante, un auxiliar de suspensión, un agente 10 emulsionante o un agente de recubrimiento. Aunque la dosificación variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y la gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse, la vía de administración y la forma del fármaco, en general se 15 recomienda una dosificación diaria de 0,01 a 2000 mg del compuesto para un paciente humano adulto, y esto puede administrarse en una dosis única o en dosis divididas.

El metabolismo de la glucosa puede alterarse, y los síntomas asociados a la diabetes de tipo II pueden 20 disminuirse o eliminarse según una administración "controlada" de un péptido PYY, pudiendo utilizarse uno o más índices apropiados para el metabolismo de la glucosa y/o diabetes de tipo II para evaluar la eficacia del tratamiento 25 (incluyendo dosificación y/o momento adecuado): por ejemplo, tolerancia a la glucosa, nivel de glucosa, nivel de insulina, sensibilidad a la insulina o hemoglobina glicosilada.

Necesita identificarse un momento eficaz para 30 administrar un agente terapéutico de PYY. Esto puede llevarse a cabo mediante experimentación rutinaria como se describe más adelante usando uno o más grupos de animales (preferentemente al menos 5 animales por grupo). En animales, la actividad insulinotrópica por el tratamiento con PYY puede evaluarse administrando un agente terapéutico de PYY en un momento particular del día y midiendo el efecto 35 de la administración (si lo hay) midiendo uno o más índices asociados al metabolismo de la glucosa, preferentemente

liberación de insulina, y comparando los valores de postratamiento de estos índices con los valores de los mismos índices antes del tratamiento, o para controlar tratamientos.

5 El momento preciso de la administración y/o la cantidad de un agente terapéutico de PYY que proporcionará los resultados más eficaces en términos de eficacia de tratamiento en un paciente dado dependerá de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de un compuesto 10 particular, condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y fase de enfermedad, condición física general, sensibilidad a una dosificación dada y tipo de medicación), vía de administración, etc. Sin embargo, las pautas anteriores pueden usarse como base para el ajuste del 15 tratamiento, por ejemplo, determinando el tiempo y/o la cantidad óptima de administración que no requerirá más de experimentación rutinaria consistente en monitorizar el sujeto y ajustar la dosificación y/o el momento adecuado.

20 Mientras el sujeto está siendo tratado, el metabolismo de la glucosa se monitoriza midiendo uno o más de los índices relevantes en momentos predeterminados durante un periodo de 24 horas. El tratamiento (cantidades, veces de administración y tipo de medicación) puede ajustarse (optimizarse) según los resultados de tal monitorización. El 25 paciente se reevalúa periódicamente para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros, produciéndose la primera reevaluación tal normalmente al final de cuatro semanas desde el comienzo de la terapia, y produciéndose las reevaluaciones posteriores cada 4 a 8 semanas durante la terapia y luego cada 3 meses después de esto. La terapia 30 puede continuar durante varios meses o incluso años, siendo seis meses una duración típica de terapia para seres humanos.

35 Los ajustes a la(s) cantidad(es) de fármaco(s) administrado(s) y posiblemente al momento de administración pueden hacerse basándose en estas reevaluaciones. Por ejemplo, si después de 4 semanas de tratamiento uno de los

índices metabólicos no ha mejorado, pero al menos sí otro, la dosis podría aumentarse 1/3 sin cambiar el tiempo de administración.

El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más 5 pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después de esto, la dosificación debería aumentarse en pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por comodidad, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones 10 durante el día, si se desea.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en este documento significa la cantidad de, por ejemplo, un agente terapéutico de PYY que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado intensificando, por ejemplo, la 15 sensibilidad a glucosa de células β pancreáticas a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este documento para referirse a cualquier PYY, material, 20 composición y/o forma farmacéutica que está dentro del alcance del juicio médico formal adecuado para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación acorde a una relación 25 beneficio/riesgo razonable.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una carga líquida o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o 30 material de encapsulación que participa en llevar o transportar el producto químico objeto desde un órgano o porción del cuerpo hasta otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales 35 que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares tales como lactosa, glucosa y

sacarosa; (2) almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; 5 (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) 10 polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) 15 solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se 20 refiere a las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de un agente terapéutico de PYY. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del agente terapéutico de PYY o haciendo reaccionar por separado un agente 25 terapéutico de PYY purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislar la sal así formada. Sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, 30 laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares (véase, por ejemplo, Berge y col. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19)

35 En otros casos, los PYY útiles en los métodos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, pueden formar sales

farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de base inorgánica y orgánica relativamente no tóxicas de un agente terapéutico de PYY. Estas sales pueden prepararse asimismo *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del agente terapéutico de PYY, o haciendo reaccionar por separado el agente terapéutico de PYY purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada tal como el hidróxido, 5 carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, 10 calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge y col., anteriormente). 15

En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, además de agentes colorantes, agentes antiadherentes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y 20 perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; 25 (2) antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 30 sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las formulaciones útiles en los métodos de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración

oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, por aerosol y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método muy conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del hospedador que está tratándose, el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria será generalmente la cantidad de compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por cien, esta cantidad oscilará de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 5 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente el 10 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento.

Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un agente terapéutico de PYY al vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniformemente e íntimamente un agente terapéutico de PYY a vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración por vía oral puede estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de un agente terapéutico de PYY

como principio activo. Un compuesto también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para administración por vía oral (por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, 5 comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o sustancias de relleno tales como 10 almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes tales como glicerina; (4) agentes de 15 disgregación tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) 20 agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerina; (8) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como un talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio 25 y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina 30 llenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. 35 Los comprimidos pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo,

5 glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del péptido o peptidomimético en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

10 Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse o prepararse opcionalmente con recubrimientos y vainas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. 15 También pueden formularse de manera que se proporcione una liberación lenta o controlada del principio activo allí dentro usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de 20 composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y puede ser de una composición tal que libere el (los) principio(s) 25 activo(s) sólo(s), o preferencialmente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de un modo retardado. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. 30 El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

35 Las formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como, por

5 ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

10 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

15 Las suspensiones, además de los agentes terapéuticos activos de PYY o composiciones celulares, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de 20 aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

25 Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un suppositorio que puede prepararse mezclando uno o más agentes terapéuticos de PYY con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de suppositorio o un salicilato, y que es sólida a temperatura ambiente, pero líquida a temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o la cavidad vaginal y 30 liberará el agente activo.

Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray que contienen tales vehículos como se sabe en la técnica que son apropiados.

35 Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un agente terapéutico de PYY incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles,

disoluciones, parches e inhalantes. El componente activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

5 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del agente terapéutico de PYY, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, 10 talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y sprays pueden contener, además de un agente terapéutico de PYY, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias.

15 Los sprays pueden contener adicionalmente propulsores tradicionales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos sin sustituir volátiles tales como butano y propano.

20 Los agentes terapéuticos de PYY pueden administrarse alternativamente mediante aerosol. Esto se lleva a cabo preparando un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Podría usarse una suspensión no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarburo). Se prefieren nebulizadores sónicos debido a 25 que minimizan la exposición del agente a romper, que puede producir degradación del compuesto.

Generalmente, un aerosol acuoso se prepara formulando una disolución o suspensión acuosa del agente junto con vehículos y estabilizadores farmacéuticamente aceptables 30 convencionales. Los vehículos y estabilizadores varían con los requisitos del compuesto particular, pero normalmente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronics o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina de suero, ésteres de sorbitano, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de 35 azúcar. Los aerosoles se preparan generalmente a partir de disoluciones isotónicas.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar liberación controlada de un agente terapéutico de PYY al cuerpo. Tales formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispersando el agente en el medio adecuado. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo del peptidomimético a través de la piel. La tasa de tal flujo puede controlarse tanto proporcionando una tasa que controle la membrana como dispersando el peptidomimético en una matriz de polímero o gel.

Las formulaciones oftálmicas, pomadas oftálmicas, polvos, disoluciones y similares también se contemplan como que están dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden un agente terapéutico de PYY en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (por ejemplo, tales como glicerina, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidex apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes

emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, 5 ácido sórbico y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina. 10

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, se desea ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material 15 cristalino o amorfo que tiene escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado 20 parenteralmente se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de un agente terapéutico de PYY o en polímeros biodegradables tales como 25 polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de fármaco con respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación de fármaco puede controlarse. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las 30 formulaciones inyectables de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido del cuerpo.

Si un agente terapéutico de PYY o composiciones 35 celulares se administran como un fármaco a seres humanos y animales, pueden administrarse por sí mismos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 al

99,5% (más preferentemente, 0,5 al 90%) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las preparaciones de agentes pueden administrarse por vía oral, parenteralmente, tópicamente o rectalmente. Por 5 supuesto, se administran mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en comprimidos o forma de cápsula, mediante inyección, inhalación, loción oftálmica, pomada, suppositorio, etc., administración mediante inyección, infusión o inhalación; 10 tópica mediante loción o pomada; y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración por vía oral.

Los términos "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se usan en este documento significan modos de administración distintos de 15 administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, 20 transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión.

Los términos "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usan en este documento significan la administración de un agente terapéutico de PYY, fármaco u otro material distinta de directamente en el sistema nervioso central, de forma que entra al sistema del paciente y, por tanto, es sometido a metabolismo y otros métodos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

30 Un agente terapéutico de PYY puede administrarse a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada que incluye por vía oral, nasal como, por ejemplo, un spray, rectalmente, intravaginalmente, parenteralmente, intracisternalmente y 35 tópicamente, como mediante polvos, pomadas o gotas, que incluye bucalmente y sublingualmente.

Independientemente de la vía de administración

seleccionada, un agente terapéutico de PYY que puede usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante 5 métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar de forma que se obtenga una cantidad 10 del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración sin ser tóxica para el paciente.

(vi) Administración conjunta

Otro aspecto de la invención proporciona una terapia 15 conjunta en la que uno o varios agentes terapéuticos van a administrarse con un péptido PYY. Tal tratamiento conjunto puede lograrse mediante la dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento.

20 En una realización, un péptido PYY va a administrarse solo o en combinación con otros agentes que aumentan la actividad biológica de PYY, el efecto biológico de PYY o para aliviar cualquier posible efecto secundario. Por ejemplo, el documento WO 9511689 describe el uso de 25 inhibidores de dipeptidilpeptidasa tales como inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa IV (DPIV), que pueden inhibir la proteólisis de PYY, aumentando así la semivida en plasma de PYY. Por tanto, en una realización preferida, un péptido PYY va a administrarse conjuntamente con un inhibidor de 30 dipeptidilpeptidasa.

Los agentes colinérgicos son potentes moduladores de la liberación de insulina que actúan mediante receptores muscarínicos. Además, el uso de tales agentes puede tener el beneficio añadido de disminuir los niveles de colesterol, a 35 la vez que aumentan los niveles de HDL. Antagonistas de receptores muscarínicos adecuados incluyen sustancias que bloquean directa o indirectamente la activación de

receptores colinérgicos muscarínicos. Tales sustancias son selectivas (o se usan en cantidades que promueven tal selectividad) para el receptor M1. Ejemplos incluyen aminas cuaternarias (por ejemplo, metantelina, ipratropio y 5 propantelina), aminas terciarias (por ejemplo, como diciclomina, escopolamina) y aminas tricíclicas (por ejemplo, telenzepina). También están incluidas pirenzepina y la metilescopolamina. Otros antagonistas de receptores muscarínicos adecuados incluyen benzotropina (comercialmente 10 disponible como COGENTIN de Merck), clorhidrato de hexahidro-sila-difenidol (clorhidrato de HHSID desvelado en Lambrecht y col. (1989) *Trends in Pharmacol. Sci.* 10(Suppl):60; hemioxalato de xanteno-9-carboxilato de (+/-)- 15 3-quinuclidinilo (hemioxalato de QNX; Birdsall y col. (1983) *Trends in Pharmacol. Sci.* 4:459; diclorhidrato de telenzepina (Coruzzi y col. (1989) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 302:232; y Kawashima y col. (1990) *Gen. Pharmacol.* 21:17) y atropina. Las dosificaciones de tales antagonistas 20 de receptores muscarínicos estarán generalmente sujetas a optimización como se ha explicado resumidamente anteriormente. En el caso de trastornos del metabolismo de los lípidos, la optimización de la dosificación puede ser necesaria independientemente de si la administración está 25 controlada mediante referencia a la ventana de sensibilidad al metabolismo de los lípidos o no.

En términos de regular el metabolismo de la insulina y de los lípidos y reducir los trastornos anteriores, un agente terapéutico de PYY o composiciones celulares también 30 pueden actuar sinérgicamente con inhibidores de prolactina tales como agonistas de dopamina d2 (por ejemplo, bromocriptina). Por consiguiente, el método descrito puede incluir la administración conjunta de tales inhibidores de prolactina como ergoalcaloides inhibidores de prolactina y 35 agonistas de dopamina inhibidora de prolactina. Ejemplos de compuestos adecuados incluyen 2-bromo-alfa-ergocriptina, 6-metil-8-beta-carbobenciloxiaminoethyl-10-alfa-ergolina, 8-acilaminoergolinas, 6-metil-8-alfa-(N-acil)amino-9-ergolina,

6-metil-8-alfa-(N-fenilacetil)amino-9-ergolina, ergocornina, 9,10-dihidroergocornina, ergolinas D-2-halo-6-alquil-8-sustituidas, D-2-bromo-6-metil-8-cianometilergolina, carbidopa, benserazida y otros inhibidores de 5 dopadescarboxilasa, L-dopa, dopamina y sales no tóxicas de las mismas.

Agonistas tales como Ach, colecistoquinina (CCK) o bombesina se unen a los receptores de la superficie celular que están acoplados mediante la proteína G heterotrimérica 10 Gq a fosfolipasa C (PLC). La ocupación de receptores activa PLC con la posterior generación de IP₃ y DAG por la hidrólisis de PIP₃. El Ca²⁺ liberado del retículo endoplásmico por IP₃ puede ser importante para la activación de las isoformas α y β de PKC y DAG puede activar las 15 isoformas α , β , δ y ϵ de PKC.

También puede usarse un agente terapéutico de PYY o 20 composiciones celulares conjuntamente con agentes que actúan en el canal de potasio dependiente de ATP de células β tales como glibenclamida, glipizida, gliclazida y AG-EE 623 ZW. PYY o su análogo o mimético también pueden aplicarse ventajosamente en combinación con otros agentes orales tales como metformina y compuestos relacionados o inhibidores de glucosidasa como, por ejemplo, acarbosa.

(vii) Detección del genotipo de PYY

25 En este documento también se describen ensayos de diagnóstico para acceder al riesgo de un paciente que desarrolla diabetes u otro trastorno metabólico de la glucosa, y para determinar la patología de pacientes que ya han sido diagnosticados con tales trastornos. La regulación 30 de PYY puede monitorizarse con el fin de identificar pacientes en riesgo de desarrollar diabetes de tipo II.

En particular, el ensayo puede evaluar una disminución 35 en el nivel de PYY en el suero u otro fluido corporal del paciente. Tales disminuciones pueden ser el resultado de, entre otros, una disminución en el nivel de expresión o secreción de PYY, o una disminución en la semivida en suero de la proteína. El ensayo también puede detectar proteínas

5 PYY mutadas, por ejemplo, basándose en la bioactividad o la aparición o desaparición de un epítopo que puede dar lugar a una disminución de la actividad, por ejemplo, reducción de la unión a receptor o pérdida o actividad agonista. Además, el ensayo puede detectar anomalías del nivel del gen PYY, por ejemplo, mutaciones puntuales tales como cambios de pares de bases, adiciones o delecciones de la secuencia codificante o secuencias reguladoras de la transcripción.

10 Por consiguiente, se proporciona el método para determinar si un sujeto está en riesgo de un trastorno caracterizado por disminución de la sensibilización a glucosa. El método puede caracterizarse generalmente como que comprende detectar en una muestra de células del sujeto la presencia o ausencia de una lesión genética caracterizada 15 por al menos uno de (i) una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica una proteína PYY, (ii) la mala expresión del gen de PYY o (iii) modificación anómala del producto génico de PYY. Para ilustrar, tales lesiones genéticas pueden detectarse determinando la existencia de al 20 menos uno de (i) una delección de uno o más nucleótidos de un gen PYY, (ii) una adición de uno o más nucleótidos a un gen PYY, (iii) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen PYY, (iv) una transposición cromosómica bruta de un gen PYY, (v) una alteración bruta en el nivel de un trascrito de 25 ARN mensajero de un gen PYY, (vii) modificación anómala de un gen PYY tal como del patrón de metilación del ADN genómico, (vii) la presencia de un patrón de corte y empalme de tipo natural de un transcríto de ARN mensajero de un gen PYY, (viii) un nivel de tipo natural de una proteína PYY, 30 (ix) pérdida alélica del PYY, y (x) modificación postraduccional inapropiada de una proteína PYY. Como se explica más adelante, se proporciona un gran número de técnicas de ensayo para detectar lesiones en un gen PYY, y lo que es más importante, proporcionar la capacidad para distinguir entre diferentes causas moleculares subyacentes 35 al crecimiento proliferación y/o diferenciación celular anómalos dependientes de PYY. El ensayo puede usarse para

detectar mutaciones puntuales de la secuencia señal de secreción que elimina el sitio de secreción de la proteína PYY madura. Por ejemplo, el ensayo puede detectar un cambio de pares de bases que da lugar a Thr (-17) - Asn o Thr (-16) - Pro.

5 Pueden usarse sondas de ácido nucleico para determinar el fenotipo de PYY de muestras de células y tejidos, por ejemplo, como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresa mal PYY, tal como 10 midiendo un nivel de un ácido nucleico que codifica PYY en una muestra de células de un paciente; por ejemplo, detectar niveles de ARNm de PYY o determinar si un gen PYY genómico ha sido mutado o delecionado.

15 Para ilustrar, pueden generarse sondas de nucleótidos a partir de los genes PYY objeto que facilitan el cribado histológico de tejido intacto y muestras de tejido para la presencia (o ausencia) de transcritos que codifican PYY. Similar a los usos de diagnóstico de anticuerpos dirigidos contra PYY, más adelante, el uso de sondas dirigidas hacia 20 mensajes de PYY o hacia secuencias de PYY genómico puede usarse para la evaluación tanto predictiva como terapéutica de mutaciones alélicas que pueden manifestarse en, por ejemplo, trastornos neoplásicos o hiperplásicos (por ejemplo, crecimiento celular no deseado) o diferenciación 25 anormal de tejido. Usado conjuntamente con inmunoensayos como se describen más adelante, las sondas de oligonucleótidos pueden ayudar a facilitar la determinación de la base molecular para un trastorno de desarrollo que puede implicar alguna anomalía asociada a expresión (o falta 30 de la misma) de una proteína PYY. Por ejemplo, la variación en la síntesis de polipéptidos, modificación postraduccional o semivida puede diferenciarse de una mutación en una secuencia codificante.

35 Se describe una composición de ácido nucleico que comprende una sonda de oligonucleótidos (purificada) que incluye una región de secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con una secuencia de sentido directo o de sentido

contrario de un gen PYY tal como se representa por SEQ ID No: 1, o mutantes que se producen naturalmente del mismo, o secuencias flanqueantes en 5' o 3' o secuencias intrónicas naturalmente asociadas al gen PYY objeto o mutantes que se producen naturalmente del mismo. El ácido nucleico de una célula se convierte en accesible para la hibridación, la sonda se expone al ácido nucleico de la muestra y se detecta la hibridación de la sonda con el ácido nucleico de muestra. Tales técnicas pueden usarse para detectar lesiones en 10 cualquiera del nivel genómico o de ARNm que incluye deletiones, sustituciones, etc., además de para determinar niveles de transcritos de ARNm.

La detección de la lesión puede comprender utilizar la sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véanse, por ejemplo las patentes de EE.UU. nº 15 4.683.195 y 4.683.202), tal como la PCR de anclaje o PCR RACE o, alternativamente, en una reacción en cadena de ligación (LCR) (véanse, por ejemplo, Landegran y col., (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa y col., (1994) *PNAS* 20 91:360-364), pudiendo ser la última particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen PYY. El método puede incluir las etapas de (i) recoger una muestra de células de un paciente, (ii) aislar ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, (iii) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con un gen PYY bajo condiciones tales que se produzca la hibridación y la amplificación del gen PYY (si está presente), y (iv) detectar la presencia o ausencia de 25 un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control.

En el ensayo, las mutaciones en un gen PYY de una célula de muestra se identifican por las alteraciones en los 35 patrones de escisión de enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de muestra y de control se aísla, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de

restricción y los tamaños de longitud del fragmento se determinan por electroforesis en gel. Además, puede usarse el uso de ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.498.531) para puntuar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión de ribozima.

Además, puede usarse cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen PYY y detectar mutaciones comparando la secuencia del PYY de muestra con la secuencia natural (control) correspondiente. Reacciones de secuenciación a modo de ejemplo incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert (*Proc. Natl Acad Sci USA* (1977) 74:560) o Sanger (Sanger y col. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci* 74:5463). También se contempla que pueda utilizarse cualquiera de una variedad de métodos de secuenciación automatizados cuando se realizan los ensayos (*Biotechniques* (1995) 19:448), incluyendo por secuenciación por espectrometría de masas (véanse, por ejemplo publicación PCT WO 94/16101; Cohen y col. (1996) *Adv Cromatogr* 36:127-162; y Griffin y col. (1993) *Appl Biochem Biotechnol* 38:147-159). Será evidente para un experto en la materia que la aparición de sólo una, dos o tres de las bases de ácidos nucleicos puede necesitar determinarse en la reacción de secuenciación. Por ejemplo, puede llevarse a cabo extensión de A o similares, por ejemplo, cuando sólo se detecta un ácido nucleico.

La memoria descriptiva también describe que la protección de los agentes de escisión (tales como una nucleasa, hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina) puede usarse para detectar bases desapareadas en heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN (Myers y col. (1985) *Science* 230:1242). En general, la técnica de la materia de la "escisión por desapareamiento" empieza proporcionando heterodúplex formados hibridando ARN o ADN (marcado) que contienen la secuencia de PYY natural con ARN o ADN posiblemente mutante obtenido de una muestra de tejido. Los

dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tal que existirán debido a desapareamientos de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN 5 pueden tratarse con RNasa e híbridos de ADN/ADN tratados con S1 nucleasa para digerir enzimáticamente las regiones desapareadas. Además, tanto los dúplex de ADN/ADN como de ARN/ADN pueden tratarse con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir regiones 10 desapareadas. Después de la digestión de las regiones desapareadas, el material resultante se separa entonces por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturizantes para 15 determinar el sitio de mutación. Véanse, por ejemplo, Cotton y col. (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba y col. (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. Además, el ADN o el ARN de control puede marcarse para la detección.

La memoria descriptiva también describe que la reacción de escisión por desapareamiento emplea una o más proteínas que reconocen pares de bases desapareadas en ADN bicatenario 20 (las llamadas enzimas de "reparación de desapareamientos de ADN") en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en ADNc de PYY obtenidos a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en desapareamientos G/A y la timidina ADN 25 glicosilasa de células HeLa escinde T en desapareamientos G/T (Hsu y col. (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). Una sonda basada en una secuencia de PYY, por ejemplo, una secuencia de PYY natural, puede hibridarse con un ADNc u 30 otro producto de ADN de célula(s) de prueba. El dúplex se trata con una enzima de reparación de desapareamientos de ADN, y los productos de escisión, si los hay, pueden detectarse a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.459.039.

35 Además, pueden usarse las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en genes PYY. Por ejemplo, puede usarse el polimorfismo de conformación

monocatenario (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y naturales (Orita y col. (1989) *Proc Natl. Acad Sci USA* 86:2766, véanse también Cotton (1993) *Mutat Res* 283:125-144; 5 y Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79). Los fragmentos de ADN monocatenarios de ácidos nucleicos de PYY de muestra y control serán desnaturizados y se les permitirá renaturalizarse. La estructura secundaria de ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia, la 10 alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede intensificarse usando ARN (en vez de ADN) en el que la estructura 15 secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. El método descrito puede utilizar análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en cambios en la movilidad electroforética (Keen y col. (1991) *Trends Genet* 7:5).

20 También se ensaya el movimiento de fragmentos mutantes o naturales en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizante usando electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Myers y col. (1985) *Nature* 313:495). Si se usa DGGE como método de análisis, el 25 ADN se modificará para asegurar que no se desnaturiza completamente, por ejemplo, añadiendo un cepo de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por PCR. Además, puede usarse un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente desnaturizante para las diferencias de identidad en la 30 movilidad de ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones 35 puntuales incluyen, pero no se limitan a, hibridación de oligonucleótidos selectivos, amplificación selectiva o extensión de cebadores selectivos. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores de oligonucleótidos en los que la

mutación conocida se coloca centradaamente y luego se hibrida con ADN diana en condiciones que sólo permiten la hibridación si se encuentra un apareamiento perfecto (Saiki y col. (1986) *Nature* 324:163); Saiki y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Tales técnicas de hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo pueden usarse para probar una mutación por reacción cuando los oligonucleótidos se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o varias mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos están 5 unidos a la membrana de hibridación y se hibridan con ADN diana marcado.

Alternativamente, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación por PCR selectiva puede usarse conjuntamente con el método descrito. 10 Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs y col. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) o en el 15 extremo 3' de un cebador en el que, bajo condiciones apropiadas, pueden evitarse desapareamientos, o reducirse la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). Además, puede desearse introducir un sitio de restricción 20 novedoso en la región de la mutación para crear detección basada en escisión (Gasparini y col. (1992) *Mol. Cell Probes* 25 6:1). Se anticipa que la amplificación también puede realizarse usando Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). En tales casos, la 30 ligación sólo se producirá si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia en 5', haciendo que sea posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

La memoria descriptiva también describe que los 35 patrones de metilación anómala de un gen PYY pueden detectarse digiriendo ADN genómico de una muestra de paciente con una o más endonucleasas de restricción que son

sensibles a metilación y para las que existen sitios de reconocimiento en el gen PYY (incluyendo en las secuencias flanqueantes e intrónicas). Véase, por ejemplo, Buiting y col. (1994) *Human Mol Gener* 3:893-895. El ADN digerido se separa por electroforesis en gel y se hibrida con sondas derivadas de, por ejemplo, secuencias genómicas o de ADN. El estado de metilación del gen PYY puede determinarse comparando el patrón de restricción generado a partir del ADN de muestra con el de un patrón de metilación conocido.

10 El nivel de una proteína PYY puede detectarse por inmunoensayo. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de suero, y el nivel de una proteína PYY presente en la muestra puede cuantificarse por de técnicas de inmunoensayo convencionales.

15 El ensayo objeto puede diseñarse para detectar modificación postraduccional anómala de la proteína PYY tal como fosforilación anómala, prenilación, modificación de lípidos, ubiquitinación y/o degradación. El ensayo también puede usarse para evaluar la localización de tejidos de PYY.

20 Según el método de diagnóstico y de pronóstico descrito en este documento se detectan alteraciones del locus de PYY natural que producen la pérdida de función de PYY. Además, el método puede realizarse detectando el locus de PYY natural y confirmando la falta de una predisposición para 25 diabetes en el locus de PYY. "Alteración de un gen natural" engloba todas las formas de mutaciones que incluyen delecciones, inserciones y mutaciones puntuales en las regiones codificantes y no codificantes. Las delecciones pueden ser de todo el gen o de sólo una parte del gen. Las mutaciones puntuales pueden producir codones de terminación, 30 mutaciones por desfase del marco de lectura o sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones somáticas son aquellas que sólo se producen en ciertos tejidos y no son heredadas en la línea germinal. Por tanto, el hallazgo de mutaciones de PYY puede proporcionar tanto información de diagnóstico como de pronóstico. Un alelo de PYY que no está deletreado (por ejemplo, encontrado en el cromosoma hermano de un cromosoma

que lleva una delección de PYY) puede cribarse para otras mutaciones tales como inserciones, pequeñas delecciones y mutaciones puntuales. Los acontecimientos de mutaciones puntuales pueden producirse en regiones reguladoras tales como en el promotor del gen, conduciendo a la pérdida o disminución de expresión del ARNm. Las mutaciones puntuales también pueden abolir el procesamiento de ARN apropiado, conduciendo a la pérdida de la expresión del producto génico de PYY, o a una disminución en la estabilidad o eficiencia de traducción de ARNm.

Como se ha expuesto anteriormente, las técnicas de diagnóstico útiles incluyen, pero no se limitan a, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), secuenciación directa de ADN, análisis por PFGE, análisis de transferencia de Southern, análisis de conformación monocatenaria (SSCA), ensayo de protección de RNasa, oligonucleótido específico de alelo (ASO), análisis de transferencia puntual LCR y PCR - SSCP.

Continuando con la discusión anterior, hay varios métodos que pueden usarse para detectar la variación de secuencias de ADN. La secuenciación directa de ADN, tanto la secuenciación manual como la secuenciación fluorescente automatizada, puede detectar la variación de secuencias. Para un gen tan grande como PYY, la secuenciación manual no es necesariamente muy laboriosa, y bajo condiciones óptimas, las mutaciones en la secuencia codificante de un gen rara vez se perderán. Otra solución es el ensayo de polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCA). Este método no detecta todos los cambios de secuencias, especialmente si el tamaño del fragmento de ADN es superior a 200 pb, pero puede optimizarse para detectar la mayoría de las variaciones de las secuencias de ADN. La reducida sensibilidad de la detección es una desventaja, pero el aumento de rendimiento posible con SSCA hace que sea una alternativa viable atractiva para dirigir la secuenciación a la detección de mutaciones durante una investigación. Los fragmentos que tienen movilidad desfasada en geles de SSCA se secuencian

luego para determinar la naturaleza exacta de la variación de secuencias de ADN. Otra solución basada en la detección de desapareamientos entre las dos cadenas de ADN complementarias incluye electroforesis en gel desnaturalizante fijado (CDGE), análisis de heterodúplex (HA) y escisión por desapareamiento químico (CMC). Ninguno de los métodos descritos anteriormente detectará grandes 5 deleciones, duplicaciones o inserciones, ni detectará una mutación reguladora que afecte la transcripción o traducción 10 de la proteína. Otros métodos que pueden detectar estas clases de mutaciones tales como un ensayo de truncamiento de proteínas o el ensayo asimétrico sólo detectan tipos específicos de mutaciones y no detectarían mutaciones de 15 aminoácidos. Una vez se conoce una mutación puede utilizarse una solución de detección específica de alelo tal como 20 hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) para cribar rápidamente grandes cantidades de otras muestras para esa misma mutación.

Puede realizarse un análisis preliminar rápido para detectar polimorfismos en secuencias de ADN mirando en una serie de transferencias Southern de ADN cortadas con una o más enzimas de restricción, preferentemente con una gran cantidad de enzimas de restricción. Cada transferencia 25 contiene una serie de individuos normales y una serie de casos de cáncer, tumores, o ambos. Las transferencias Southern que muestran fragmentos de hibridación (que se diferencian en la longitud del ADN de control cuando se sondan con secuencias próximas o que incluyen el locus de PYY) indican una posible mutación. Si se usan enzimas de restricción que producen fragmentos de restricción muy largos, entonces se emplea electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

La detección de mutaciones puntuales puede llevarse a cabo por clonación molecular del (de los) alelo(s) de PYY y secuenciación del (de los) alelo(s) usando técnicas muy conocidas en la técnica. Alternativamente, las secuencias 35 del gen pueden amplificarse directamente a partir de una

preparación de ADN genómico usando técnicas conocidas. Entonces, puede determinarse la secuencia de ADN de las secuencias amplificadas.

Hay muchos métodos muy conocidos para una prueba más completa, todavía indirecta, para confirmar la presencia de un alelo de susceptibilidad que incluyen: 1) análisis de conformación monocatenaria (SSCA); 2) electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE); 3) ensayos de protección de RNasa; 4) oligonucleótidos específicos de alelo (ASO); 5) el uso de proteínas que reconocen desapareamientos de nucleótidos tales como la proteína mutS de *E. coli*; y 6) PCR específica de alelo. Para la PCR específica de alelo se usan cebadores que se hibridan en sus extremos 3' con una mutación de PYY particular. Si la mutación de PYY particular no está presente, no se observa un producto de amplificación. También puede usarse la amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (ARMS) como se desvela en la publicación de solicitud de patente europea nº 0332435. Las inserciones y delecciones de genes también pueden detectarse mediante clonación, secuenciación y amplificación. Además, pueden usarse sondas de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores circundantes para puntuar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico.

Un método tal es particularmente útil para cribar parientes de un individuo afectado para la presencia de la mutación de PYY encontrada en ese individuo. Pueden usarse otras técnicas para detectar inserciones y delecciones como se conocen en la técnica.

En los tres primeros métodos (SSCA, DGGE y ensayo de protección de RNasa) aparece una nueva banda electroforética. SSCA detecta una banda que migra de forma diferente debido a que el cambio de secuencias produce una diferencia en el apareamiento de bases intramoleculares monocatenarias. La protección de RNasa implica la escisión del polinucleótido mutante en dos fragmentos más pequeños o

más. DGGE detecta diferencias en las tasas de migración de secuencias mutantes en comparación con secuencias naturales usando un gel con gradiente desnaturalizante. En un ensayo de oligonucleótidos específico de alelo se diseña un oligonucleótido que detecta una secuencia específica, y el ensayo se realiza detectando la presencia o la ausencia de una señal de hibridación. En el ensayo de mutS, la proteína sólo se une a secuencias que contienen un desapareamiento de nucleótidos en un heterodúplex entre secuencias mutantes y naturales.

Los desapareamientos según la presente invención son dúplex de ácidos nucleicos hibridados en los que las dos cadenas no tienen el 100% de complementariedad. La falta de homología total puede ser debida a delecciones, inserciones, inversiones o sustituciones. La detección de desapareamientos puede usarse para detectar mutaciones puntuales en el gen o en su producto de ARNm. Aunque estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más sencillas de realizar en un gran número de muestras de tumor. Un ejemplo de una técnica de escisión por desapareamiento es el método de protección de RNasa. En la práctica de la presente invención, el método implica el uso de una ribosonda marcada que es complementaria a la secuencia codificante del gen PYY natural humano. La ribosonda y tanto el ARNm como el ADN aislado del tejido tumoral están fusionados (hibridados) juntos y posteriormente se digieren con la enzima RNasa A que puede detectar algunos desapareamientos en una estructura de ARN dúplex. Si la RNasa A detecta un desapareamiento, se escinde en el sitio del desapareamiento. Por tanto, si la preparación de ARN fusionada se separa en una matriz de gel electroforético, si un desapareamiento ha sido detectado y escindido por RNasa A, se verá un producto de ARN que es más pequeño que el ARN dúplex de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o ADN. La ribosonda no necesita ser la longitud completa del ARNm o gen de PYY, pero puede ser un segmento de cualquiera. Si la ribosonda comprende sólo un

segmento del ARNm o gen de PYY, se deseará usar varias de estas sondas para cribar la secuencia de ARNm completa para los desapareamientos.

En un modo similar pueden usarse sondas de ADN para detectar desapareamientos mediante escisión enzimática o química. Alternativamente, los desapareamientos pueden detectarse mediante desfases en la movilidad electroforética de dúplex desapareados con respecto a dúplex apareados. Con tanto ribosondas como con sondas de ADN, el ARNm o ADN 10 celular que puede contener una mutación puede amplificarse usando PCR (véase más adelante) antes de la hibridación. Los cambios en el ADN del gen PYY también pueden detectarse usando hibridación de Southern, especialmente si los cambios son transposiciones macroscópicas tales como delecciones e 15 inserciones.

Las secuencias de ADN del gen PYY que han sido amplificadas usando PCR también pueden cribarse usando sondas específicas de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácidos nucleicos, conteniendo cada uno una región de la 20 secuencia del gen PYY que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede tener aproximadamente 30 nucleótidos de longitud correspondientes a una parte de la secuencia del gen PYY. Usando una batería de tales sondas específicas de alelo pueden cribarse productos de 25 amplificación por PCR para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen PYY. La hibridación de sondas específicas de alelo con secuencias de PYY amplificadas puede realizarse, por ejemplo, sobre un filtro de nailon. La hibridación con una sonda particular 30 bajo condiciones de hibridación rigurosas indica la presencia de la misma mutación en el tejido de tumor que en la sonda específica de alelo.

La prueba más definitiva para las mutaciones en un locus candidato es comparar directamente secuencias de PYY genómicas de pacientes diabéticos con aquellas de una población de control. Alternativamente, podría secuenciarse ARN mensajero después de la amplificación, por ejemplo, por

PCR, eliminándose así la necesidad de determinar la estructura de exones del gen candidato.

Las mutaciones de pacientes diabéticos que se encuentran fuera de la región codificante de PYY pueden detectarse examinando las regiones no codificantes tales como intrones y secuencias reguladoras próximas o dentro del gen PYY. Una indicación temprana de que las mutaciones en regiones no codificantes son importantes puede proceder de los experimentos de transferencia de Northern que revelan moléculas de ARN mensajero de tamaño anormal o abundancia en pacientes diabéticos con respecto a individuos de control.

La alteración de la expresión de ARNm de PYY puede detectarse por cualquier técnica conocida en la materia. Éstas incluyen análisis de transferencia de Northern, amplificación por PCR y protección de RNasa. La disminución de la expresión de ARNm indica una alteración del gen PYY natural. La alteración de genes PYY naturales también puede detectarse cribando la alteración de la proteína PYY natural. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales inmunoreactivos con PYY para cribar un tejido. La falta de antígeno relacionado indicaría una mutación de PYY. También podrían usarse anticuerpos específicos para productos de alelos mutantes para detectar producto génico de PYY mutante. Tales ensayos inmunológicos pueden hacerse en cualquier forma conveniente conocida en la técnica. Éstas incluyen transferencias de Western, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos de ELISA. Puede usarse cualquier medio para detectar una proteína de PYY alterada para detectar la alteración de genes PYY naturales. Pueden usarse ensayos funcionales tales como determinaciones de unión a proteína. Además, pueden usarse ensayos que detectan la función bioquímica de PYY. El encontrar un producto génico de PYY mutante indica la alteración de un gen PYY natural.

Los genes PYY mutantes o productos génicos también pueden detectarse en otras muestras corporales humanas tales como suero, heces, orina y esputo. Las mismas técnicas

tratadas anteriormente para la detección de genes PYY mutantes o productos génicos en tejidos pueden aplicarse a otras muestras corporales. Las células cancerosas se liberan de tumores y aparecen en tales muestras corporales. Cribando tales muestras corporales puede lograrse un simple diagnóstico precoz para muchos tipos de trastornos metabólicos de la glucosa que implica la pérdida de sensibilización a glucosa pancreática. Además, el progreso de la quimioterapia o la radioterapia puede monitorizarse más fácilmente probando tales muestras corporales para genes PYY mutantes o productos génicos.

Los pares de cebadores de la presente invención son útiles para la determinación de la secuencia de nucleótidos de un alelo de PYY particular usando PCR. Los pares de cebadores de ADN monocatenario pueden fusionarse a secuencias dentro de o que rodean el gen PYY en el cromosoma con el fin de amplificar por cebado la síntesis de AND del propio gen PYY. Un conjunto completo de estos cebadores permite la síntesis de todos los nucleótidos de las secuencias codificantes del gen PYY, es decir, los exones. El conjunto de cebadores permite preferentemente la síntesis de tanto secuencias de intrones como de exones. También pueden usarse cebadores específicos de alelo. Tales cebadores se fusionan sólo con alelos mutantes de PYY particulares y, por tanto, sólo amplificarán un producto en presencia del alelo mutante como molde.

Con el fin de facilitar la posterior clonación de secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener secuencias de sitios de enzimas de restricción añadidas a sus extremos 5'. Por tanto, todos los nucleótidos de los cebadores se derivan de secuencias de PYY o secuencias adyacentes a PYY, excepto los pocos nucleótidos necesarios para formar un sitio de enzimas de restricción. Tales enzimas y sitios son muy conocidos en la técnica. Los propios cebadores pueden sintetizarse usando técnicas que son muy conocidas en la técnica. Generalmente, los cebadores pueden prepararse usando máquinas sintetizadoras de

oligonucleótidos que están comercialmente disponibles. Dada la secuencia del marco de lectura abierto de PYY mostrado en SEQ ID NO:1, el diseño de cebadores particulares, además de los desvelados más adelante, también está dentro de la 5 habilidad de la materia.

(ix) Procedimientos de uso: Diagnóstico de ácidos nucleicos y kits de diagnóstico

Con el fin de detectar la presencia de un alelo de PYY que predispone a un individuo a diabetes, se prepara una 10 muestra biológica tal como una muestra de sangre o biopsia y se analiza para la presencia o ausencia de alelos de susceptibilidad de PYY. Con el fin de detectar la presencia de diabetes, la progresión hacia diabetes o como un indicador pronóstico, una muestra biológica se prepara y se 15 analiza para la presencia o ausencia de alelos de PYY mutantes. Los resultados de estas pruebas e información interpretativa son devueltos al personal sanitario para la comunicación al individuo probado. Tales diagnósticos pueden realizarse mediante laboratorios de diagnóstico o 20 alternativamente se fabrican kits de diagnóstico y se comercializan a personal sanitario o a individuos privados para el autodiagnóstico.

Inicialmente, el método de cribado puede implicar amplificación de las secuencias de PYY relevantes. El método 25 de cribado puede implicar una estrategia no basada en PCR para la amplificación tal como amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA) y similares. Tales métodos de cribado pueden incluir metodologías de amplificación de marcas en dos etapas que son muy conocidas en la técnica. 30 Tanto las estrategias de cribado basadas en PCR como no basadas en PCR pueden detectar secuencias diana con un alto nivel de sensibilidad.

El método más popular usado hoy en día es la amplificación diana. Aquí, la secuencia de ácidos nucleicos 35 diana se amplifica con polimerasas. Un método particularmente preferido usando amplificación impulsada por polimerasa es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa y otros ensayos de amplificación impulsados por polimerasa pueden lograr un aumento de más de un millón en el número de copias mediante el uso de ciclos de amplificación accionada por polimerasa. 5 Una vez se ha amplificado, el ácido nucleico resultante puede secuenciarse o usarse como un sustrato para sondas de ADN.

Si las sondas se usan para detectar la presencia de las secuencias diana (por ejemplo, en el cribado de 10 susceptibilidad a diabetes), la muestra biológica que va a analizarse, tal como sangre o suero, puede tratarse, si se desea, para extraer los ácidos nucleicos. El ácido nucleico de muestra puede prepararse en diversas formas para facilitar la detección de la secuencia diana; por ejemplo, 15 desnaturalización, digestión por restricción, electroforesis o transferencia puntual. La región elegida como diana del analito ácido nucleico normalmente debe ser al menos parcialmente monocatenaria para formar híbridos con la secuencia que elige diana de la sonda. Si la secuencia es 20 naturalmente monocatenaria, no se requerirá desnaturalización. Sin embargo, si la secuencia es bicatenaria, probablemente la secuencia necesitará desnaturalizarse. La desnaturalización puede llevarse a cabo por diversas técnicas conocidas en la técnica.

25 El ácido nucleico analito y la sonda se incuban en condiciones que promueven la formación de híbridos estables de la secuencia diana en la sonda con la secuencia elegida como diana original en el analito. La región de las sondas que se usa para unirse al analito puede prepararse completamente complementaria a la región elegida como diana del cromosoma humano que incluye el gen PYY. Por tanto, se desean altas condiciones de rigurosidad con el fin de prevenir falsos positivos. Sin embargo, las condiciones de alta rigurosidad sólo se usan si las sondas son complementarias a regiones del cromosoma que son únicas en 30 el genoma. La rigurosidad de hibridación se determina por varios factores durante la hibridación y durante el método 35

de lavado que incluyen temperatura, fuerza iónica, composición de la base, longitud de la sonda y concentración de formamida. Estos factores se explican resumidamente en, por ejemplo, Maniatis y col., anteriormente, y Sambrook y col., anteriormente. En ciertas circunstancias puede desearse la formación de híbridos de mayor orden tales como triplex, quadrúplex, etc., para proporcionar los medios de detección de secuencias diana.

La detección, si se produce, del híbrido resultante se realiza normalmente usando sondas marcadas. Alternativamente, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable por la unión específica a un ligando que está marcado tanto directamente como indirectamente. Las marcas adecuadas, y los métodos para marcar sondas y ligandos, son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas que pueden incorporarse mediante métodos conocidos (por ejemplo, traslación de mellas, cebado o fosforilado aleatorio), biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, particularmente dioxetanos desencadenados), enzimas, anticuerpos y similares. La variaciones de este esquema básico se conocen en la técnica e incluyen aquellas variaciones que facilitan la separación de los híbridos que van a detectarse de materiales externos y/o que amplifican la señal del resto marcado.

Como se ha observado anteriormente, en la presente invención también se contemplan ensayos de cribado no basados en PCR. Un método no basado en PCR a modo de ejemplo es la hibridación de una sonda de ácido nucleico (o un análogo tal como un esqueleto de fosfonato de metilo que sustituye el fosfodiéster normal) a la diana de ADN de bajo nivel. Esta sonda puede tener una enzima covalentemente ligada a la sonda de forma que el enlace covalente no interfiera con la especificidad de la hibridación. Este complejo de conjugado enzima-sonda-ácido nucleico diana puede entonces aislar la conjugado de sonda-enzima y se añade un sustrato para la detección de enzimas. La actividad

enzimática se observa como un cambio en el revelado de color o salida luminiscente que produce un aumento de 10^3 - 10^6 en la sensibilidad.

En la técnica se conocen metodologías de amplificación de marcas de dos etapas. Estos ensayos parten del principio que un pequeño ligando (tal como digoxigenina, biotina o similares) está unido a una sonda de ácido nucleico que puede unirse específicamente con PYY. Las sondas a modo de ejemplo pueden desarrollarse basándose en la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1. Las sondas específicas de alelo también se contemplan dentro del alcance de este ejemplo, y sondas específicas de alelo a modo de ejemplo incluyen sondas que engloban las mutaciones predisponentes que producen la pérdida de secreciones de PYY de una disminución en la semivida en suero.

En un ejemplo, el ligando pequeño unido a la sonda de ácido nucleico es específicamente reconocido por un conjugado anticuerpo-enzima. En una realización de este ejemplo, la digoxigenina está unida a la sonda de ácido nucleico. La hibridación se detecta por un conjugado de anticuerpo-fosfatasa alcalina que hace de sustrato quimioluminiscente. En un segundo ejemplo, el ligando pequeño es reconocido por un segundo conjugado ligando-enzima que puede complejarse específicamente con el primer ligando. Una realización muy conocida de este ejemplo es el tipo de interacciones de biotina-avidina.

También se contempla dentro del alcance de la presente invención que los ensayos de sondas de ácido nucleico descritos en este documento puedan emplear una mezcla de sondas de ácido nucleico que puedan detectar secuencias de PYY. Por tanto, en un ejemplo para detectar la presencia de PYY en una muestra de células se emplea más de una sonda complementaria a PYY y en particular el número de sondas diferentes es alternativamente 2, 3 ó 5 secuencias de sondas de ácidos nucleicos diferentes. En otro ejemplo, para detectar la presencia de mutaciones en la secuencia del gen PYY en un paciente se emplea más de una sonda complementaria

a PYY en la que la mezcla incluye sondas que pueden unirse a las mutaciones específicas de alelo identificadas en poblaciones de pacientes con alteraciones en PYY. En este caso puede usarse cualquier número de sondas, e incluirán preferentemente sondas correspondientes a las mutaciones de genes principales identificadas como predisponentes a individuo a, por ejemplo, un cáncer particular.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de islotes

10 Se compraron péptidos de hormonas derivadas del intestino que incluyen PP, NPY, NPK, PYY, secretina, GLP-1 y bombesina de Sigma. Se obtuvo colagenasa de tipo XI de Sigma. El medio de cultivo RPMI 1640 y el suero bovino fetal se obtuvieron de Gibco. Un kit de radioinmunoensayo que 15 contiene un anticuerpo dirigido contra insulina (kit de $[^{125}\text{I}]$ -RIA) se compró de Linco, St Louis.

Se obtuvieron islotes de rata posparto de ratas de P0-2 años. Los islotes de rata adulta se obtuvieron de ratas de 6-8 semanas. Los islotes de rata fetal se obtuvieron del 20 siguiente modo. Se sacrificaron ratas hembra gestantes en el día de gestación e21. Los fetos se sacaron del útero. De cada camada se diseccionaron 10-14 páncreas y se lavaron dos veces en tampón Hanks. Los páncreas se reunieron, se suspendieron en 6 ml de 1 mg/ml de colagenasa (tipo XI, 25 Sigma) y se incubaron a 37°C durante 8-10 minutos con agitación constante. La digestión se detuvo añadiendo 10 volúmenes de tampón Hanks frío en hielo seguido de tres lavados con tampón Hanks. Entonces, los islotes se purificaron por gradiente de Ficoll y se cultivaron en suero bovino fetal al 10% (FBS)/medio RPMI con o sin adición de IBMX 1 μM . Al final de cinco días se recogieron a mano 20 islotes en cada tubo y se ensayaron para la liberación de insulina estática. Generalmente, los islotes se lavaron primero con tampón KRP y luego se incubaron con 1 ml de 30 tampón KRP que contenía glucosa 3 mM (baja) durante 30 minutos a 37°C con agitación constante. Después de recoger el sobrenadante, los islotes se incubaron entonces con

glucosa 17 mM (alta) durante una hora a 37°C. La insulina liberada a partir de la estimulación con glucosa baja o alta se ensayó por radioinmunoensayo (RIA) usando el kit [¹²⁵I]-RIA (véase la Figura 1).

5 **Ejemplo 2: Entrada de calcio estimulada por IBMX en isletos de e21.**

Se aislaron isletos de e21 y se cultivaron según el Ejemplo 1. Entonces, los isletos se trataron con glucosa 17 mM o IBMX 1 µM en glucosa 3 mM (baja) (Figura 2). Los 10 isletos de e21 insensibles a glucosa no experimentaron un aumento en la entrada de calcio intracelular tras la adición de alta glucosa. La adición de IBMX indujo una entrada de calcio, sugiriendo que el mecanismo de IBMX que estimuló la liberación de insulina en isletos de e21 también utiliza la 15 activación de canales de calcio. Esto sugiere adicionalmente que el aumento de la capacidad de respuesta a glucosa observado en isletos P0 se produce aguas arriba del canal de calcio.

20 **Ejemplo 3: PYY induce la maduración de isletos fetales.**

Se aislaron isletos de rata fetal como en el Ejemplo 1. Los isletos fetales de e21 se cultivaron durante 5 días en presencia de 200 ng/ml de PYY, PPP, CCK, NPK, NPY, secretina, GLP-1 o bombesina. Entonces, la liberación de insulina estimulada con glucosa se midió en cada grupo de 25 cultivo (Figura 3A y 3B). El PYY estimuló significativamente la capacidad de los isletos para responder a glucosa secretando insulina. Los péptidos relacionados tales como PPP y NPY, que comparten aproximadamente el 70% de homología de aminoácidos, no estimularon el aumento de la capacidad de 30 respuesta a glucosa.

35 **Ejemplo 5: El efecto de PYY sobre isletos de e21 depende del tiempo.**

Se aislaron isletos de rata fetal como en el Ejemplo 1. Entonces, los isletos de e21 se cultivaron durante 2, 5 ó 7 días con 200 ng/ml de PYY. Entonces, en cada grupo de cultivo se midió la liberación de insulina estimulada con glucosa (Figura 4). El grupo de control mostró un ligero

aumento de la capacidad de respuesta a glucosa después de 5 días en cultivo en comparación con los momentos de tiempo de 0 y 2 días (triángulos) como se mide por la liberación de insulina. La adición de PYY durante 5 días casi duplicó la cantidad de insulina liberada en respuesta a glucosa en comparación con el control. Este efecto se mantuvo en el momento de tiempo de 7 días. Obsérvese que no hubo efecto de PYY sobre el aumento de la capacidad de respuesta a glucosa después de 2 días de incubación de PYY.

10 **Ejemplo 5:** *La respuesta a dosis de PYY muestra que la dosis óptima es 200 ng/ml.*

Se aislaron islotes de rata fetal como en el Ejemplo 1. Se añadió PYY a islotes de e21 a 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml durante cinco días. Entonces, la liberación de insulina estimulada por glucosa se midió en cada grupo de cultivo (Figura 5). El efecto óptimo de PYY se observó a 200 ng/ml, como se mide por la liberación de insulina. Se disminuyó el efecto de PYY a 500 y 1000 ng/ml, observándose esto último previamente en la Figura 5.

20 **Ejemplo 6:** *Efecto de PYY sobre islotes adultos.*

Se aislaron islotes de rata adulta como en el Ejemplo 1 y se trataron durante un periodo de 16 días con medio de control o con medio que contenía 200 ng/ml de PYY. Entonces, la liberación de insulina estimulada por glucosa se midió en los días indicados (Figura 6). Los islotes adultos perdieron secreción de insulina estimulada por glucosa en el plazo de 2 días en cultivo en medio que contenía SBF al 10% convencional. Sin embargo, el PYY pudo rescatar la sensibilidad incluso después de 10 días en cultivo y más (Figura 7).

30 **Ejemplo 7:** *El efecto de PYY sobre el aumento de la capacidad de respuesta a glucosa requiere la activación de la transcripción de genes.*

Se aislaron islotes de rata fetal como en el Ejemplo 1 y se trataron con 200 ng/ml de PYY durante 5 días con la adición de actinomicina D a 0,1 µg/ml durante las últimas 16 horas, con y sin la adición de IBEX 1 µM. Entonces, la

liberación de insulina estimulada por glucosa se midió en cada grupo de cultivo (Figura 8). La actinomicina D pudo inhibir completamente el aumento de la función inducida por PYY como se mide por la liberación de insulina. Esto no es debido a toxicidad no específica del fármaco para los islotes ya que el IBMX todavía puede inducir exocitosis de insulina en islotes tratados con actinomicina D.

5 **Ejemplo 8: El efecto de actinomicina D no está mediado por la disminución del contenido de insulina en los islotes.**

10 Se aislaron islotes de rata fetal como en el Ejemplo 1 y se trataron con 200 ng/ml de PYY durante 5 días con la adición de actinomicina D a 0,1, 0,2, 0,5 y 1,0 μ g/ml durante las últimas 16 horas. Entonces, el contenido de insulina se midió en cada grupo de cultivo (Figura 9). La tabla muestra que el aumento de la cantidad de actinomicina D no disminuyó significativamente el contenido global de insulina en islotes.

15 **Ejemplo 9: PYY no afecta la tasa de secreción basal.**

20 Se aislaron islotes de rata de e21 y P14 como en el Ejemplo 1 y se trataron con 200 ng/ml de PYY. Entonces, los islotes se lavaron y se ensayaron para la capacidad de respuesta a glucosa como se mide por la liberación de insulina. Entonces se añadió PYY al tampón de ensayo (Krebs-fosfato de Ringer) para determinar si la presencia de PYY afectó extremadamente las tasas de secreción de insulina tanto basal como estimulada. Entonces, la tasa de insulina estimulada por glucosa se midió en cada grupo de cultivo (Figura 10A). El efecto de la adición de PYY al tampón de ensayo fue insignificante, que indica que el efecto primario de PYY se ejerce durante el periodo de cultivo en el que está presente. Como control positivo se incluyeron islotes P14 recientemente aislados.

25 **Ejemplo 10: Efecto de PYY sobre el restablecimiento de respuesta a glucosa en islotes de rata adulta.**

30 Se aislaron islotes de rata adulta como en el Ejemplo 1

y se cultivaron en SBF al 10% durante 7 días, tiempo durante el cual se añadieron 200 ng/ml de PYY al medio de cultivo en los días indicados en la Figura 10B. Los islotes cultivados durante siete días solos perdieron la sensibilidad a glucosa, sin embargo, cuando se añadió PYY en los últimos 2 a 3 días antes del final del ensayo, se restableció la respuesta a glucosa. Cuando el PYY estuvo presente en el cultivo durante cinco días o más, pareció que había perdido su función de restablecimiento, sugiriendo la posibilidad de degradación de la señal del péptido.

LISTADO DE SECUENCIAS

95

gccaaccacg cccacgtcat ttgcatacgc actccccacc ccagaaaaccc ggattctgcc	461
tccegaeggc ggcgctctggg cagggttcgg gtgcggccct cccggcggt ctcgggtcccc	521
ccggcccccctg ggctggaggg ctgtgtgtgg tccttccctg gtcggaaaat aaagagcaaa	581
t	582

<210> 2

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Phe Val Arg Arg Pro Trp Pro Ala Leu Thr Thr Val Leu Leu			
1	5	10	15

Ala Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu Val Asp Ala Tyr Pro Ile Lys		
20	25	30

Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr		
35	40	45

Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr		
50	55	60

Gly Lys Arg Asp Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ser Lys Thr Phe Phe Pro			
65	70	75	80

Asp Gly Glu Asp Arg Pro Val Arg Ser Arg Ser Glu Gly Pro Asp Leu		
85	90	95

<210> 3

<211> 36

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu			
1	5	10	15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr	
---	--

89

20

25

30

Arg Gln Arg Tyr

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para inducir, potenciar, recuperar o mantener la sensibilidad a glucosa de células o islotes pancreáticos que comprende poner en contacto células o islotes pancreáticos con un péptido YY (péptido PYY), en el que el péptido PYY produce la maduración de islotes insensibles a glucosa en islotes maduros que responden a glucosa liberando insulina, y en el que el péptido PYY se selecciona de: i) un péptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condición rigurosa, que incluye una etapa de lavado con 0,2X SSC a 65°C, con SEQ ID NO: 1, ii) un péptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos al menos idéntica el 70% a SEQ ID NO: 2, o iii) un péptido que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.
2. Un método *in vitro* para identificar un agonista de PYY que comprende administrar a un isloote o célula pancreático/a una cantidad eficaz de un agente y comparar la respuesta celular al agente con la respuesta celular a PYY, en el que PYY está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.
3. Método de la reivindicación 2 que comprende además cribar una biblioteca de ADN.
4. Método de la reivindicación 2, en el que el agonista se produce naturalmente.
5. Uso de una composición que comprende un péptido PYY para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada a metabolismo alterado de la glucosa, en el que el péptido PYY produce maduración de islotes insensibles a glucosa en islotes maduros que responden a glucosa liberando insulina, y en el que el péptido PYY se selecciona de: i) un péptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones

rigurosas, que incluye una etapa de lavado con 0,2X SSC a 65°C, con SEQ ID NO: 1, ii) un péptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 2, o iii) un péptido que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.

6. Uso de la reivindicación 5, en el que la enfermedad se selecciona de resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, falta de sensibilidad a la glucosa, hiperglucemia, 10 obesidad, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia o diabetes mellitus.

7. Uso de la reivindicación 6, en el que la enfermedad es diabetes mellitus de tipo I o de tipo II.

15 8. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células pancreáticas incluyen células exocrinas.

20 9. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células pancreáticas incluyen células endocrinas.

25 10. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células pancreáticas incluyen células α , β , δ o φ .

30 11. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la administración del péptido PYY hace que las células o islotes pancreáticos sean sensibles a glucosa.

12. Método de la reivindicación 11, en el que dichas células o islotes sensibles a glucosa producen insulina cuando se tratan con glucosa.

35 13. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula o isla pancreático es un isla o

célula fetal o posparto.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula o isplete pancreático se trata adicionalmente con un inhibidor de dipeptidilpeptidasa, insulina o GLP-1.

15. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la composición farmacéutica va a administrarse conjuntamente tanto simultánea, secuencial como por separado con un inhibidor de dipeptidilpeptidasa, insulina o GLP-1.

16. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 ó 15, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración sistémica.

17. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, 15 ó 16, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración por vía oral, bucal, sublingual, parenteral, nasal, tópicamente, rectalmente o vaginal.

18. Uso de la reivindicación 17, en el que la administración parenteral es por inyección subcutánea.

19. Uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 ó 15 a 17, en el que la composición farmacéutica está en forma de un comprimido, cápsula, inyección, aerosol, spray, loción, pomada, polvo, gota o supositorio.

20. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 8 a 14 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 ó 16 a 20, en el que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 2.

21. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 8 a 14 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones

5 a 7 ó 15 a 19, en el que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3.

5 22. Un islote o célula β funcionalmente maduro generado en cultivo celular poniendo en contacto células sin diferenciar de un animal con un péptido PYY, en el que el péptido PYY produce la maduración de islotes insensibles a glucosa en islotes maduros que responden a glucosa liberando insulina, 10 y en el que el péptido PYY se selecciona de: i) un péptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones rigurosas, que incluye una etapa de lavado con 0,2X SSC a 65°C, con SEQ ID NO: 1, ii) un péptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos que es 15 al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 2, o iii) un péptido que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.

23. Célula de la reivindicación 22, en la que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 2.

24. Célula de la reivindicación 22, en la que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3.

25 25. Célula de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en la que la célula de islotes β maduros secreta insulina en respuesta a glucosa.

30 26. Un animal no humano transgénico en el que las rutas inductivas de PYY son inhibidas en uno o más tejidos de dicho animal por la interrupción de un gen que codifica un péptido PYY, en el que el péptido PYY produce la maduración de islotes insensibles a glucosa en islotes maduros que responden a glucosa liberando insulina, y en el que el péptido PYY se selecciona de: i) un péptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo

condiciones rigurosas, que incluye una etapa de lavado con 0,2X SSC a 65°C, con SEQ ID NO: 1, ii) un péptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 2, o iii) un péptido que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.

27. Un péptido PYY para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada al metabolismo alterado de la glucosa, en el que el péptido PYY produce la maduración de islotes insensibles a glucosa en islotes maduros que responden a glucosa liberando insulina, y en el que el péptido PYY se selecciona de: i) un péptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones rigurosas, que incluye una etapa de lavado con 0,2X SSC a 65°C, con SEQ ID NO: 1, ii) un péptido que está constituido por una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 2, o iii) un péptido que está constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 3.

28. Péptido PYY de la reivindicación 27, en el que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 2.

29. Péptido PYY de la reivindicación 27, en el que el péptido PYY está constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 3.

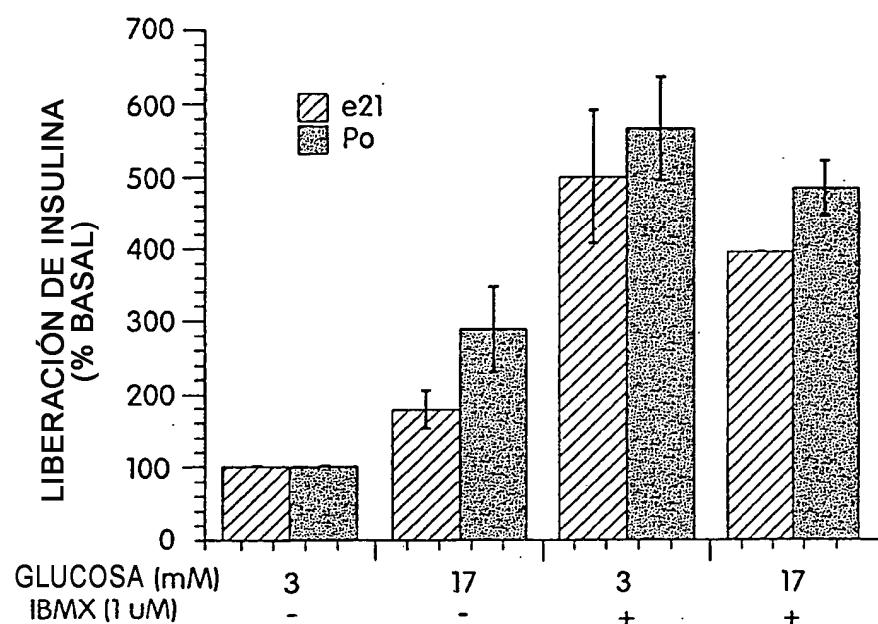


Fig. 1

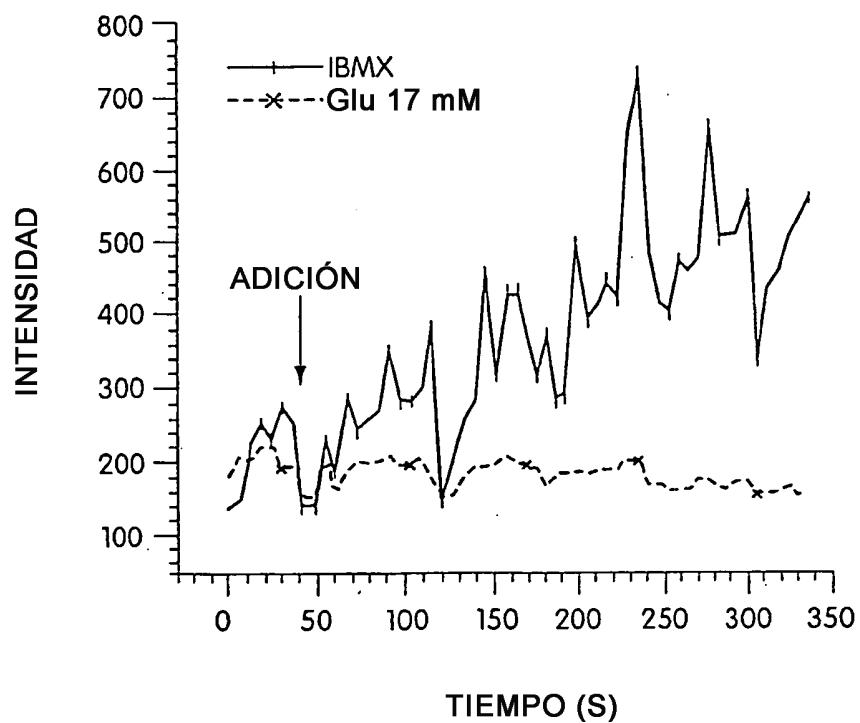


Fig. 2

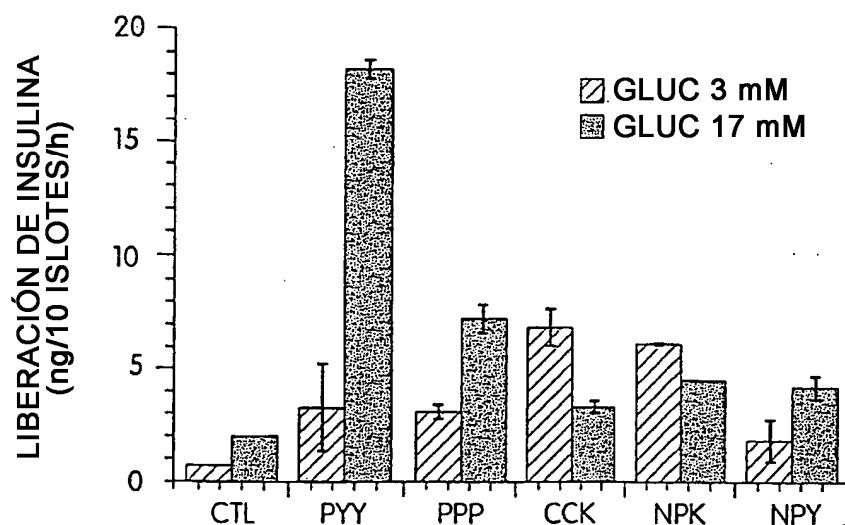


Fig. 3A

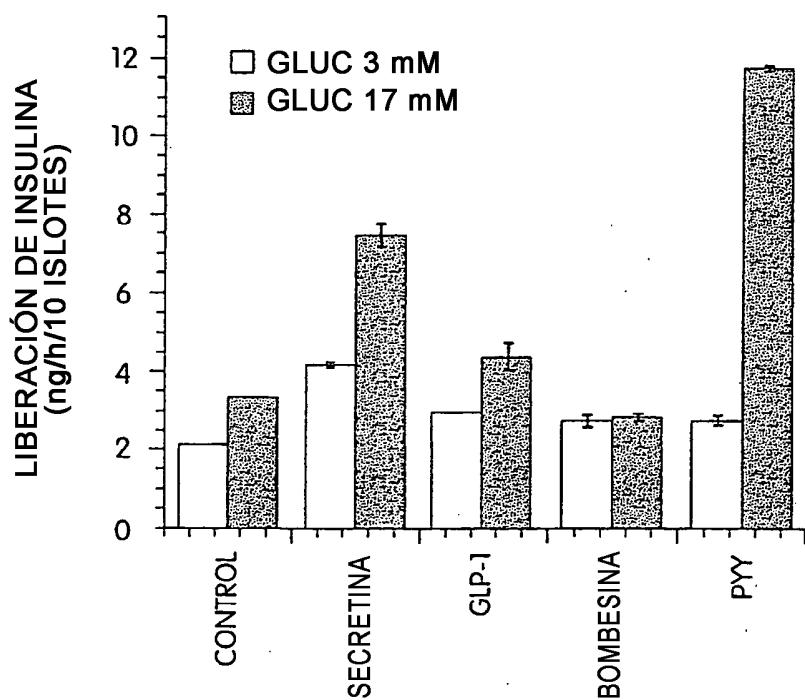


Fig. 3B

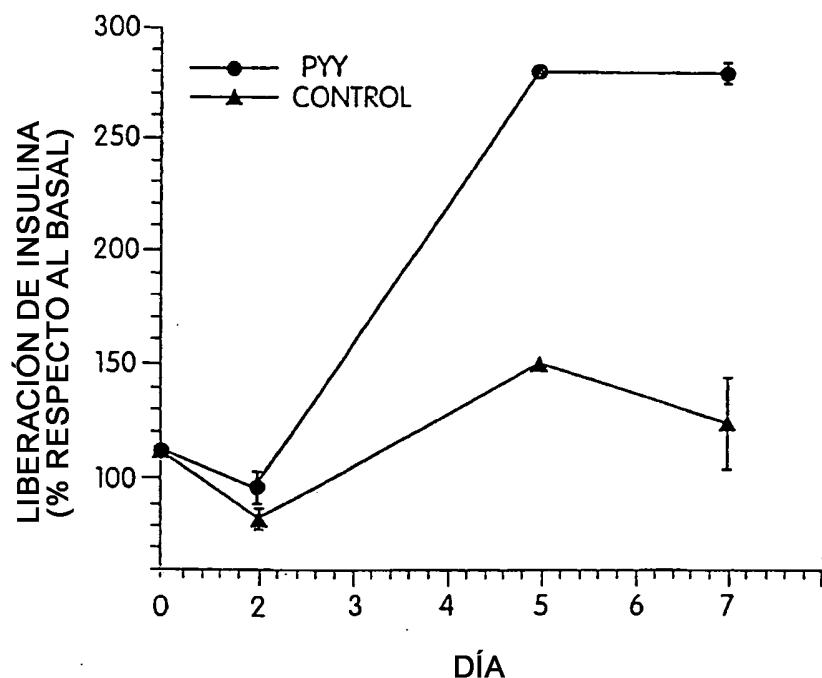


Fig. 4

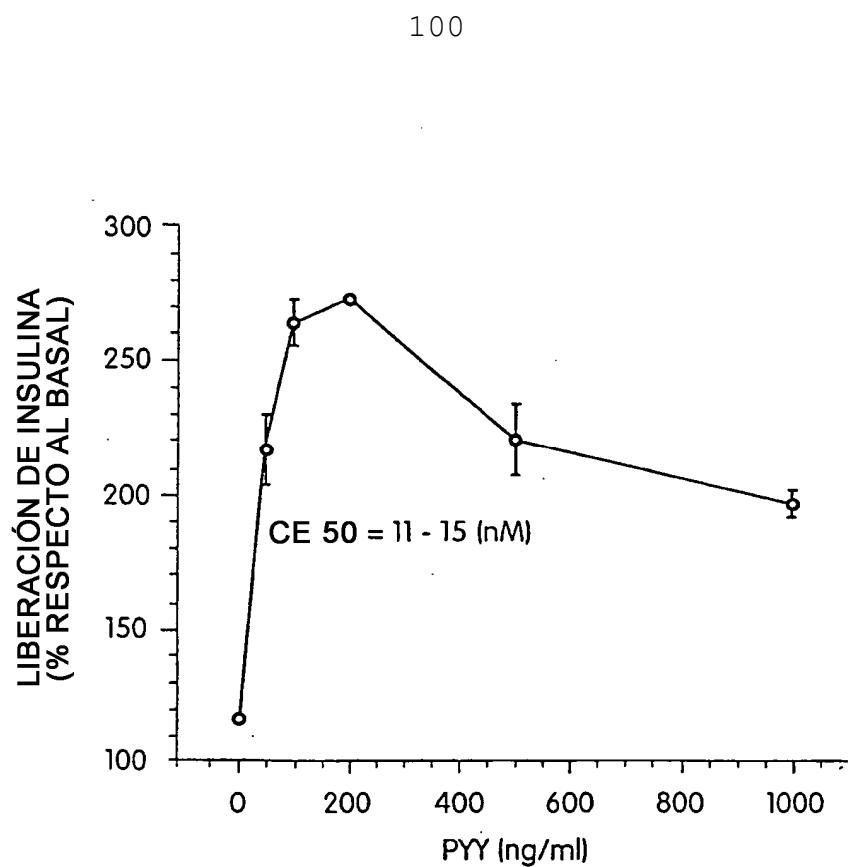


Fig. 5

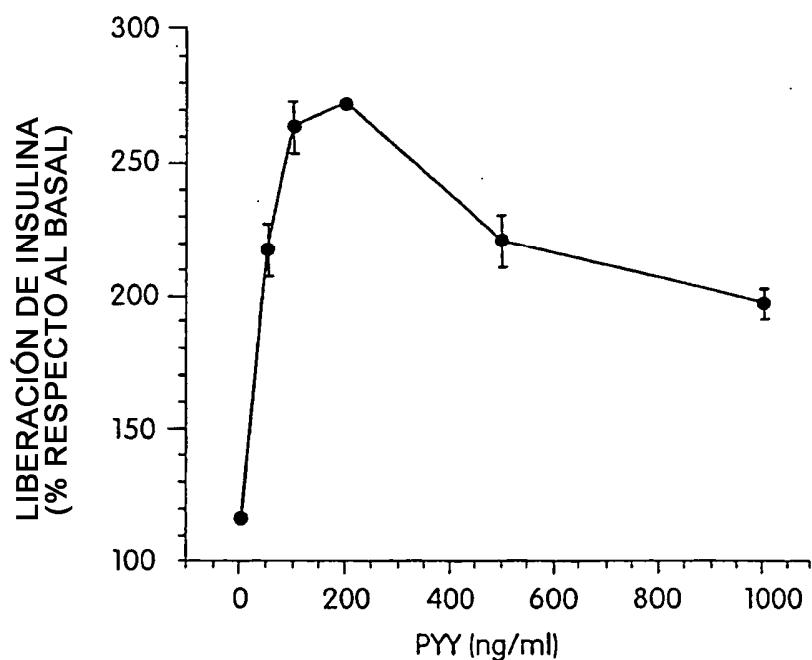


Fig. 6

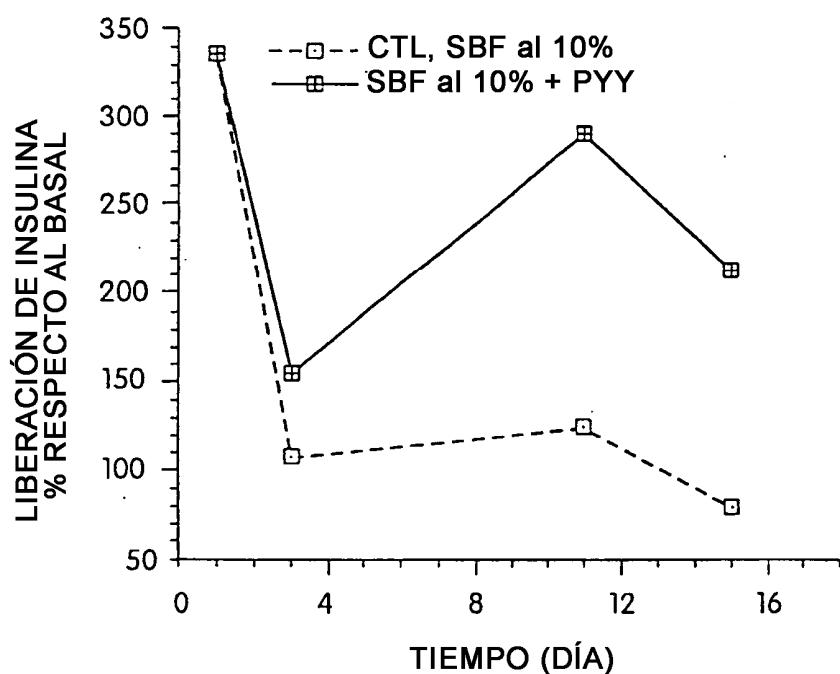


Fig. 7

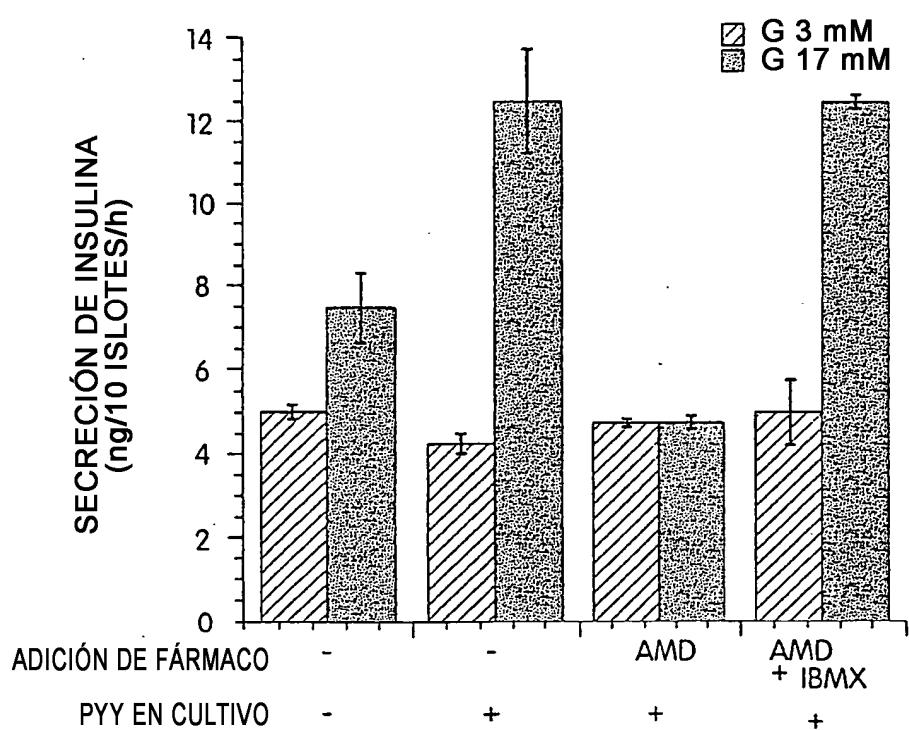


Fig. 8

CONTENIDO DE INSULINA EN ACTINOMICINA D
PYY TRATADO / ISLOTES DE e21

AMD (ug/ml)	INSULINA (ng/10 ISLOTES)
0	213 +/- 6.36
0.1	200 +/- .89
0.2	180 +/- 7.8
0.5	175 +/- 20.9
1.0	210 +/- 7.8

Fig. 9

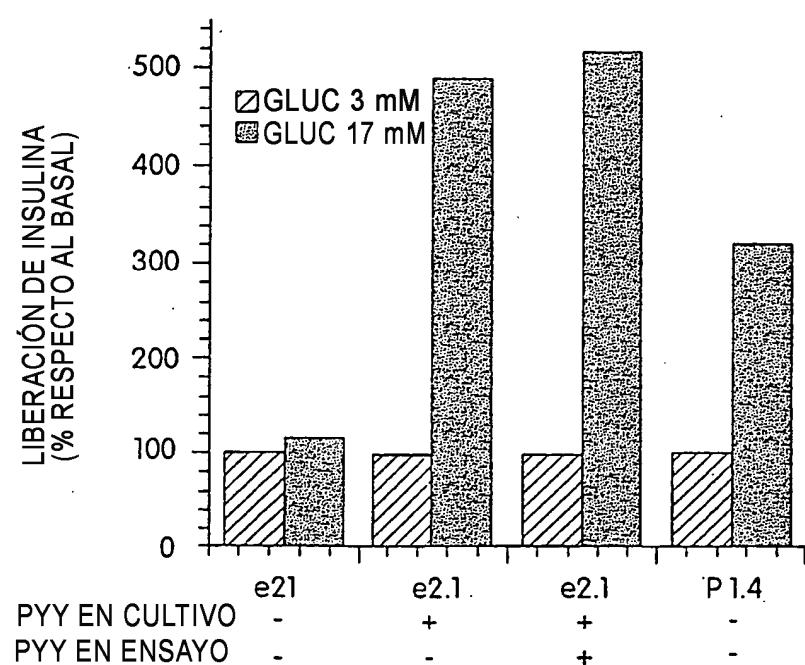


Fig. 10A

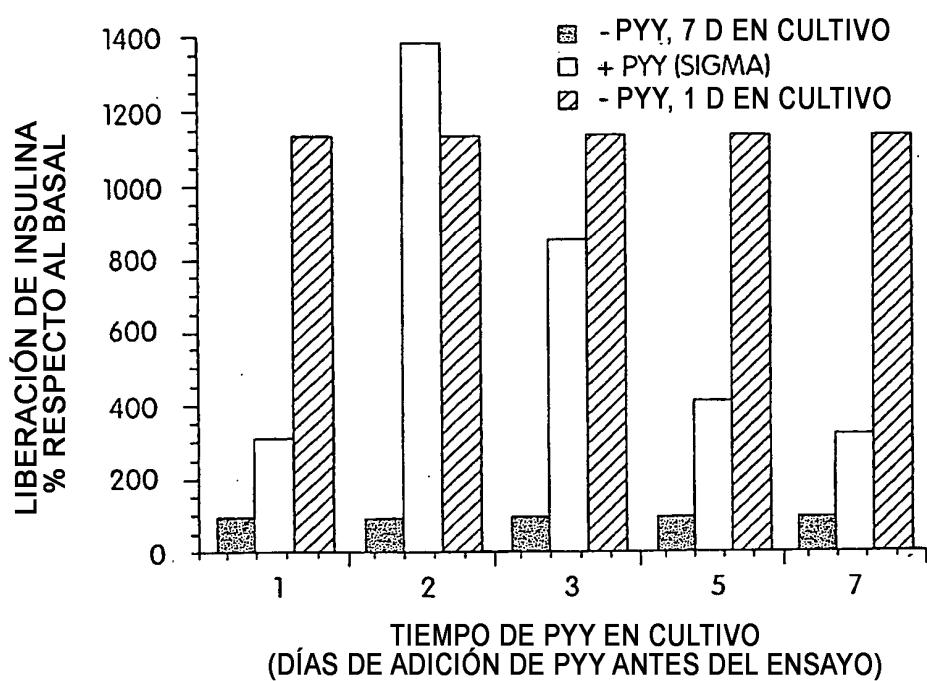


Fig. 10B