


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

INDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 0209603 0000005 Folios: 78
 Fecha (FIR): 2005-09-23 17:29:38
 Trámite: REC. PATENTES B 1 REGISTRAR 329 COMPLETAR
 Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS OPERACIONES

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES 2000-F03

1	SOLICITUD DE ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre BAYER CORPORATION sociedad constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Indiana, Estados Unidos de América Dirección 100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15205, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio Pittsburgh, Pennsylvania Estados Unidos de América Teléfono 546 09 70 Fax 547 31 70 E-mail clientes@camyp.com	IDENTIFICACION CC ☐ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre Emilio FERRERO Dirección Carrera 4ª No 72-35 Teléfono 347 38 11 Fax 211 86 50 E-mail cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION CC ☒ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Número 438.019 TP 31 929
4	Número de expediente <u>02 - 089.603</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada <u>Presento un nuevo capítulo descriptivo y reivindicatorio en donde se ha revisado la traducción</u> <u>Para darle mayor claridad a la solicitud</u> _____ _____ _____	
6	Comprobante de pago No. <u>05 - 69.873</u> Fecha, <u>12 de Septiembre de 2005</u>	
7	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$ 91 000 ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes cuando sean personas jurídicas	
8	NOMBRE EMILIO FERRERO FIRMA  C C 438 019 de Usaquén T P.A. 31 929	

PRP

PEPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGON Y SUS METODOS DE USO FARMACOLOGICO

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a polipéptidos recientemente identificados que actúan al mismo tiempo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon y al uso de dichos polipéptidos con fines terapéuticos. Más particularmente, los polipéptidos de la presente invención son útiles en la estimulación de la liberación de la insulina de las células beta pancreáticas en respuesta a la glucosa y en la reducción de la secreción glucagon-mediada de la glucosa del hígado, brindando de este modo una opción de tratamiento para aquellos individuos afectados de un trastorno metabólico tal como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, los estados prediabéticos y la obesidad.

ANTECEDENTES DEL ARTE RELACIONADO

La diabetes se caracteriza por una secreción deficiente de insulina que se manifiesta, entre otras cosas, por un nivel elevado de glucosa en sangre en el paciente diabético. Los defectos subyacentes conducen a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: la diabetes tipo 1 (o diabetes mellitus insulino dependiente, DMID), que surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en sus glándulas pancreáticas y la diabetes tipo 2 (o diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID), que ocurre en pacientes con secreción deficiente de insulina de las células beta y/o alteraciones en la acción de la insulina.

Los pacientes con diabetes tipo 1 se tratan actualmente con insulina, mientras que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 pueden tratarse con agentes que estimulan la función de las células beta o con agentes que intensifican la sensibilidad de los tejidos de los pacientes hacia la insulina. Con el correr del tiempo, casi la mitad de los sujetos diabéticos tipo 2 pierden su capacidad de respuesta a estos agentes y entonces deben someterse a terapia insulínica. Las drogas utilizadas actualmente para

tratar la diabetes tipo 2 incluyen los inhibidores de alfa-glucosidasa (PRECOSE , VOGLIBOSETM y MIGLITOL®), insulino-sensibilizantes (por ej , AvandiaTM, ActosTM y RezulinTM), secretagogos de insulina (sulfonilureas "SFUs") y otros agentes que actúan a través del canal de K⁺ ATP-dependiente), y GLUCOPHAGETM (metformina clorhidrato)

Inhibidores de alfa-glucosidasa Los inhibidores de la alfa-glucosidasa reducen la excursión de la glucosa postprandial al demorar la absorción de la glucosa del intestino. Estas drogas son seguras y proporcionan tratamiento para sujetos diabéticos afectados entre leve y moderadamente. Sin embargo, se ha informado acerca de efectos colaterales gastrointestinales en la literatura que limitan su efectividad.

Insulino-sensibilizantes Los insulino-sensibilizantes son drogas que intensifican la respuesta del organismo a la insulina. Las tiozolidindionas tales como AvandiaTM (rosiglitazona) y ActosTM, activan al receptor gamma activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR) y modulan la actividad de un conjunto de genes que no han sido bien descritos. Los efectos hepáticos (por ej , la hepatotoxicidad inducida por drogas y los niveles elevados de enzimas hepáticas) no parecen ser un problema significativo en pacientes que utilizan AvandiaTM y ActosTM. Aun así, se recomienda el análisis de las enzimas hepáticas cada dos meses en el primer año de terapia y en forma periódica con posterioridad. Los tratamientos con AvandiaTM y ActosTM se asocian a retención de fluidos, edema y aumento de peso. AvandiaTM no está indicada para usar con la insulina debido a la preocupación por la insuficiencia cardíaca congestiva. RezulinTM (troglitazona), la primera droga de esta clase, se abandonó debido a los elevados niveles de las enzimas hepáticas y a la hepatotoxicidad inducida por drogas.

Secretagogos de Insulina Las sulfonilureas (SFUs) y las no-sulfonilureas, Nateglinida y Pepaglinida, actúan a través del canal de potasio ATP-dependiente provocando la secreción de insulina glucosa-dependiente. Estas drogas son una terapia estándar para los diabéticos de tipo 2 que sufren hiperglucemia entre leve y moderada. Los secretagogos de insulina tienen limitaciones que incluyen la inducción potencial de

hipoglucemia, el aumento de peso y las tasas elevadas de fracaso primario y secundario. Entre un diez y un 20% de los pacientes tratados inicialmente no logran demostrar un efecto significativo en el tratamiento (fracaso primario). El fracaso secundario se demuestra por una pérdida adicional del 20-30% del efecto en el tratamiento luego de seis meses de tratamiento con secretagogos de insulina. Se requiere tratamiento con insulina en el 50% de los pacientes que responden a los secretagogos de insulina después de 5-7 años de terapia (Scheen et al, Diabetes Res Clin Pract 6 533-543, 1989). La Nateglinida y la Repaglinida son drogas de corta acción que deben tomarse tres veces por día. Se utilizan solo para el control de la glucosa post-prandial y no para el control de la glucosa en ayunas.

GLUCOPHAGE™ es una biguanida que reduce la glucosa sanguínea disminuyendo la producción de glucosa hepática e incrementando la captación y utilización de la glucosa periférica. La droga es efectiva para la reducción de la glucosa sanguínea en sujetos afectados entre leve y moderadamente y no posee un efecto colateral de aumento de peso o inducción potencial de hipoglucemia. Sin embargo, el GLUCOPHAGE™ tiene una cantidad de efectos colaterales, incluyendo trastornos gastrointestinales y acidosis láctica. El GLUCOPHAGE™ está contraindicado en diabéticos por encima de los 70 años de edad y en sujetos con deterioro de la función renal o hepática. Finalmente, el GLUCOPHAGE™ posee las mismas tasas de fracaso primario y secundario que los secretagogos de insulina.

El tratamiento con insulina se establece después que la dieta, el ejercicio y las medicaciones orales han fracasado en el control adecuado de la glucemia. Este tratamiento tiene varios inconvenientes: es inyectable, puede causar hipoglucemia y puede causar aumento de peso. La posibilidad de inducir hipoglucemia con la insulina limita la medida en que se puede controlar la hipoglucemia.

Los problemas con los actuales tratamientos requieren de nuevas terapias para tratar la diabetes de tipo 2. En particular, se necesitan nuevos tratamientos para mantener la secreción de insulina normal (es decir, glucosa-dependiente). Dado el papel de los péptidos similares al glucagón ("GLP-1") en la promoción de la secreción

insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de dichas enfermedades. Es más, los antagonistas del receptor del glucagón deberían demostrar ser valiosos en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

Los GLP-1 y el glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista estructural: la familia glucagón/secretina. Dentro de esta familia, el GLP-1(7-36) y el GLP-1(7-37) (30 aminoácidos y 31 aminoácidos, respectivamente) y el glucagón (30 aminoácidos) constituyen un conjunto de péptidos altamente homólogos. Además, estas dos hormonas se originan a partir de un precursor común, el preglucagón, el cual, al procesarse en tejidos específicos, conduce a la producción de GLP-1 en forma predominante en el intestino y de glucagón en el páncreas. Los receptores de estos dos péptidos son homólogos (58% de identidad) y pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína-G.

El GLP-1 y el glucagón desempeñan, ambos, papeles principales en la homeostasis global de la glucosa. El GLP-1 reduce las concentraciones de glucosa plasmática mediado por la secreción de insulina glucosa-dependiente, mientras que el glucagón aumenta las concentraciones de glucosa plasmática. Dados los importantes papeles del GLP-1 y el glucagón en el mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa sanguínea, ha habido un interés considerable por la identificación de los agonistas del receptor del GLP-1 y de los antagonistas del receptor del glucagón. Estudios clínicos han demostrado la capacidad de la infusión de GLP-1 para promover la secreción de insulina y normalizar la glucosa plasmática en sujetos diabéticos. Sin embargo, el GLP-1 se degrada rápidamente y tiene una vida media muy corta en el organismo. Asimismo, el GLP-1 produce efectos colaterales de motilidad intestinal en o en las cercanías de sus dosis terapéuticas. Por ende, el propio GLP-1 tiene limitaciones significativas como agente terapéutico y se están buscando versiones modificadas del péptido con estabilidad mejorada. No se han descrito hasta la fecha agonistas no peptídicos del receptor del GLP-1.

Se han identificado análogos peptídicos del glucagon que actúan como antagonistas del glucagon y reducen la hiperglucemia en ratas diabéticas. Sin embargo, ningún antagonista peptídico del glucagon ha avanzado más allá del desarrollo preclínico. Una cantidad de antagonistas no peptídicos del receptor del glucagon de estructuras diversas se han informado en la literatura científica y de patentes. Sin embargo, los intentos por identificar inhibidores del receptor del glucagon molecularmente pequeños han encontrado limitado éxito in vivo. El único antagonista de la acción del glucagon que se sabe activo en un estudio clínico es un compuesto identificado como BAY 27-9955. Un efecto colateral potencial del antagonismo frente al glucagon es la hipoglucemia.

Debido a los efectos colaterales potenciales asociados con la administración tanto de un agonista del receptor de GLP-1 como de un antagonista del receptor del glucagon solos, una terapia combinada tendría la ventaja de mantener la disminución buscada de la glucemia reduciendo los efectos colaterales. La co-administración, sin embargo, requiere una formulación única y un enfoque de administración que brinde perfiles farmacocinéticos apropiados para ambos péptidos. Este podría ser un obstáculo fundamental para el desarrollo de semejante terapia.

Sobre la base de lo anterior, existe un considerable potencial para un péptido de terapia única que funcione tanto como agonista del GLP-1 como antagonista del glucagon in vivo.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Esta invención provee polipéptidos novedosos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon y que son efectivos en el tratamiento de enfermedades y condiciones que pueden aliviarse por agentes que tengan actividad de agonistas del receptor del GLP-1 y de antagonistas del receptor del glucagon. Los polipéptidos de la presente invención proveen una nueva terapia para pacientes con, por ejemplo, trastornos metabólicos tales como los resultantes de la secreción disminuida de insulina endógena, en particular los diabéticos de tipo 2, o para

pacientes con intolerancia a la glucosa, un estado prediabético que tiene una leve alteración de la secreción de Insulina, o la intolerancia a la glucosa en ayunas, u obesidad

Un aspecto de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS 6-32, como así también fragmentos, derivados y variantes de polipéptidos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon a un nivel sustancialmente igual al de los polipéptidos que se muestran en las SEC ID NOS 6-32 (colectivamente, "polipéptidos de la invención")

Otras realizaciones de la Invención incluyen a polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención y los vectores y células huésped concurrentes necesarios para expresar en forma recombinante los polipéptidos

Otras realizaciones más de la invención proporcionan métodos para el tratamiento de la diabetes y/u otras enfermedades o condiciones afectadas por polipéptidos de la invención en mamíferos, incluyendo a los humanos. Los métodos implican la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención a un mamífero

La invención también proporciona métodos recombinantes y de síntesis para preparar polipéptidos de la invención

BREVE DESCRIPCION DEL DIBUJO

La Figura 1 es un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene una secuencia codificadora de un polinucleótido de fusión de un péptido GST

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La invención proporciona polipéptidos novedosos, como así también fragmentos, derivados y variantes de los mismos que funcionan como agonistas del receptor del

GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon Los polipéptidos de la invención funcionan in vivo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon en la prevención y/o tratamiento de enfermedades o condiciones tales como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la intolerancia a la glucosa en ayunas y la obesidad

El GLP-1 y el glucagon son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista de la estructura la familia glucagon/secretina La alineación acumulada siguiente muestra as relaciones estructurales primarias

Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEC ID NO 1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 3)

Las abreviaturas de una sola letra de los aminoácidos se pueden encontrar en Zubay, Biochemistry 2da Edición, 1988, MacMillan Publishing, New York, pag 33 Estos polipéptidos desempeñan un papel en la homeostasis global de la glucosa el GLP-1 reduce las concentraciones plasmáticas de glucosa mientras que el glucagon incrementa las concentraciones plasmáticas de glucosa

Dado el papel de los GLP-1 s en la promoción de la secreción insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de trastornos metabólicos y otras enfermedades Es más, los antagonistas del receptor del glucagon deberían demostrar también ser valiosos en el tratamiento de las enfermedades, dado el papel del glucagon en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis Sin embargo, estos hechos por si solos no garantizan la reducción de la glucosa in vivo sin inducir significativos efectos colaterales

La invención proporciona polipéptidos nuevos que son agonistas del receptor de GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagon. Sin ceñirnos a la teoría, creemos que los polipéptidos de la invención son capaces de reducir los niveles de glucosa in vivo por estimulación de la liberación de insulina de las células beta pancreáticas de manera glucosa-dependiente, reduciendo al mismo tiempo la secreción de glucosa del hígado mediada por glucagon.

Polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagon

Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos activa al receptor del GLP-1 en uno o más ensayos in vitro o in vivo de activación del receptor del GLP-1. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos in vitro de inducción del cAMP en células RINm5F, ensayos in vitro de inducción de la secreción de insulina de las células beta pancreáticas, ensayos in vivo de reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y ensayos in vivo de elevación de los niveles plasmáticos de insulina, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos de la invención también demuestran actividad antagonista del receptor del glucagon en uno o más ensayos in vitro o in vivo de inhibición de la activación del receptor del glucagon. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos in vitro de inhibición del aumento del cAMP celular mediado por glucagon, ensayos in vitro para medir la inhibición de la liberación de glucosa mediada por glucagon de, por ejemplo, hepatocitos cultivados, o ensayos in vivo de producción de glucosa estimulada por glucagon, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos preferidos de la invención se seleccionan del grupo integrado por (1) SEC ID NOS 632 y (2) sus fragmentos, derivados, variantes y análogos que funcionan como antagonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor

del glucagon sustancialmente al mismo nivel que cualquiera de los polipéptidos que se muestran en SEC ID NOS 6-32

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos naturales, polipéptidos recombinantes o polipéptidos sintéticos

Los polipéptidos fragmentanos, derivados, variantes y análogos retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que, por ejemplo, los polipéptidos que se muestran en la SEC ID NOS 6-32 "Sustancialmente la misma función o actividad biológica" es aproximadamente del 30% al 100% (es decir, el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%) o más de la misma actividad biológica del polipéptido de extensión completa con el cual se compara

Derivados

Los derivados incluyen a polipéptidos de la invención que han sido modificados químicamente para otorgarles una estructura y/o función adicional. Por ejemplo, puede agregarse polietilenglicol (PEG) o un ácido graso a un polipéptido para mejorar su vida media. Se pueden construir también polipéptidos de fusión que confieran una especificidad de blanco o una actividad adicional, según se describe con mayor detalle más adelante.

Los derivados se pueden modificar ya sea por medio de un proceso natural, tal como el procesamiento postraducciona, como por medio de técnicas de modificación química, siendo ambos bien conocidos en el arte. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte del polipéptido, incluida la cadena peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. Se podrá apreciar que puede estar presente el mismo tipo de modificación en la misma o diversa medida en varios sitios de un dado polipéptido. También, una variante puede contener uno o más tipos diferentes de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser, por ejemplo, ramificados, por ejemplo, como consecuencia de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación.

Otras modificaciones químicas incluyen la acetilación, acilación, n-bosilación con ADP, amidación, unión covalente de la flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente del fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de proglutamato, formulación gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, minstollación, oxidación, incorporación de un resto de PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas, tal como la arginilación, mediada por ARN de transferencia y ubiquitinación (Ver, por ejemplo, T E Creighton, PROTEINS, STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2da Edition, W H Freeman and Company, New York (1993), POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B C Jonson, ed , Academic Press, New York, páginas 1-12 (1983), Selfter et al , Meth Enzymol 182 626-46 (1990), Ratan et al , Anna N Y Acad Sci 663 48-62, 1992)

Los derivados incluyen también a polipéptidos que se han fusionado con otro polipéptido, como por ejemplo la albúmina sérica humana, para mejorar su perfil farmacocinético. La fusión de dos polipéptidos se puede lograr por cualquier medio conocido por un experto en el arte. Por ejemplo, pueden clonarse un ADN que codifica la albúmina sérica humana y una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención en cualquier vector de expresión de mamífero conocido por un experto en el arte. Se prefiere la localización de un polipéptido de la invención en posición N-terminal respecto del otro polipéptido pues parece que se requiere una histidina N-terminal para la actividad del receptor del GLP-1 (Kawa, Endocrinology Aproximadamente, 124(49) 1768-73, 1989). La proteína de fusión recombinante resultante puede entonces expresarse transformando una línea celular adecuada, tal como HKB o CHO, con el vector y expresando la proteína de fusión.

Los derivados preferidos incluyen a polipéptidos de la invención (SEC ID NOS 6-32) a los cuales se ha unido un resto de PEG o un resto de ácido graso. El resto de PEG puede ser, por ejemplo, un PEG de peso molecular mayor de 22 kDa, con

preferencia un peso molecular de entre 25 kDa y 100 kDa (por ej , 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kDa), y con mayor preferencia un peso molecular de entre 35 kDa y 45 kDa (por ej , 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 kDa) Ejemplos de dichos polipéptidos unidos a PEG son aquellos que contienen un resto de PEG de 22 kDa unido al residuo de cisteína de la posición 31 de las SEC ID NOS 19 o 25 Ver las SEC ID NOS 20 y 26 y la Tabla 2 Como alternativa, puede estar unido un resto de PEG de 43 kDa al residuo de cisteína de la posición 31 de la SEC ID NO 25 Ver la SEC ID NO 27 y la tabla 2 Puede agregarse un resto de PEG a un residuo de cisteína de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte, ver, por ejemplo, el Ejemplo 19

Otros derivados preferidos tienen un resto de ácido graso unido al polipéptido El resto de ácido graso puede ser, por ejemplo, un ácido graso de entre C12 y C20, con preferencia un ácido graso de entre C14 y C18 y, por sobre todo, con mayor preferencia, de C16 Ejemplos de dichos polipéptidos son las SEC ID NOS 28-32, que contienen un resto de ácido graso de C16 (palmitato) unido a un residuo de lisina dentro del péptido Ver la Tabla 2 Puede agregarse un resto de ácido graso a un residuo de lisina de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte como, por ejemplo, la acilación de ácidos grasos (Knudsen et al , J Med Chem 43 1664-1669, 2000)

Variantes

Las variantes son polipéptidos de la invención que poseen uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEC ID NOS 6-32 Las variantes también pueden tener aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos modificados, es decir isómeros de péptidos, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos naturales

Con preferencia, las variantes contienen una o más sustituciones de aminoácidos conservativas (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones), con preferencia en residuos de aminoácidos no esenciales Un residuo de aminoácido "no esencial" es un

residuo que puede alterarse a partir de una secuencia de proteína de tipo salvaje sin alterar su actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una sustitución de aminoácido conservativa es aquella en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en el arte las familias de residuos de aminoácidos que poseen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen a aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ej. tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Las sustituciones no conservativas no se harían para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos con localización en un dominio de proteína conservado.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se realizan con preferencia en las posiciones 11, 12, 16, 17 o 18 del polipéptido de consenso que se muestra en la SEC ID NO 34. La posición 11 es con preferencia R, S, A, K, G o T, y con mayor preferencia R, A, G o S. La posición 12 es con preferencia K, N, R, H, A, S o Q, y con mayor preferencia K, A, S o N. La posición 16 es con preferencia K, R, V, I, L, M, F, W, Y, A, S, T, N, Q, G o H, y con mayor preferencia K, V, I, F, A, S o N. La posición 17 es con preferencia D, E, H, K, R, F, I, L, M, Y, V, W, A, S, T, N, Q o G, y con mayor preferencia R, A, L, M, V, S, H, E o Q. La posición 18 es con preferencia K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G o H, y con mayor preferencia K, R, F, I, L, Y o A. Todas las posibles combinaciones de sustituciones en las posiciones 11, 12, 16, 17 y 18, incluyendo la no-sustitución en cualquiera, en dos, en tres o en cuatro de estas posiciones, quedan previstas en forma específica.

Las variantes también incluyen a polipéptidos que difieren en su secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón pueden identificarse

detectando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, los mutantes de polipéptidos con sustituciones conservativas en 1 o más posiciones (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones) pueden ensayarse para detectar la actividad agonista del receptor del GLP-1 y la actividad antagonista del receptor del glucagon utilizando métodos bien conocidos en el arte y que se describen en los ejemplos específicos mas adelante

Análogos

Un análogo incluye a un propolipéptido, en donde el propolipéptido incluye a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Los polipéptidos activos de la invención pueden sufrir ruptura de los aminoácidos adicionales de la molécula del propolipéptido por procesos naturales in vivo o por procedimientos bien conocidos en el arte, tales como ruptura enzimática o química

Fragmentos

Un fragmento es un polipéptido menor que uno de extensión total de la invención, que incluye un derivado, variante o análogo de extensión total, que posee actividad agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del receptor del glucagon

Cualquier secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención se puede utilizar para expresar el polipéptido. Los polinucleótidos pueden consistir solo en una secuencia codificadora para un polipéptido o pueden incluir secuencias codificadoras y/o no-codificadoras adicionales

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención se pueden sintetizar en todo o en parte utilizando métodos químicos bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Caruthers et al, Nucl Acids Res Symp Ser 215-23, 1980, Horn et al, Nucl Acids Res Symp Ser 225-32, 1980). El polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego clonarse en un vector de expresión para expresar el polipéptido o en un vector de clonación, para propagar el polinucleótido

Como comprenderán aquellos con experiencia en el arte, puede resultar ventajoso producir las secuencias codificadoras de polipéptidos que posean codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procanota o eucanota para aumentar la velocidad de expresión de un polipéptido o para producir un transcripto de ARN que posea propiedades deseables, tales como la vida media, que sea mayor que la de un transcripto generado a partir de la secuencia natural.

Las secuencias nucleotídicas descritas aquí pueden prepararse mediante ingeniería genética utilizando métodos generalmente conocidos en el arte para alterar las secuencias codificadoras de polipéptidos por una variedad de razones, que incluyen, sin ser limitativos, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o del mRNA producto. La transposición del ADN mediante fragmentación aleatoria y el reensamblado de fragmentos de genes y de oligonucleótidos por PCR pueden usarse para preparar secuencias nucleotídicas mediante ingeniería genética. Por ejemplo, puede utilizarse la mutagénesis de sitio dirigido para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia por codones, producir variantes de corte, introducir mutaciones, etc.

Vectores

La presente invención también incluye a vectores de clonación y de expresión que comprenden una o más secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido de la invención. La secuencia nucleotídica puede insertarse con orientación hacia delante o hacia atrás. Una secuencia de ADN puede insertarse en un vector por una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ADN se inserta en un sitio de endonucleasa de restricción apropiado por procedimientos conocidos en el arte y descritos en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2da Edición (Cold Spring Harbor, N. Y., 1989). Se considera a estos procedimientos y a otros incluidos en el alcance de los expertos en el arte.

Ejemplos de vectores de clonación incluyen , sin ser limitativos, a pBR322, pUC18, pUC19, pSport y pCRII

En un aspecto prefendo de esta realización, un vector de expresión comprende además secuencias regulatonas, que incluyen, por ejemplo, a un promotor, ligadas operativamente a la secuencia codificadora Los expertos en el arte conocen un gran número de vectores y promotores de expresión apropiados y se pueden adquirir en el comercio Los vectores de expresión siguientes se presentan a modo de ejemplo Los vectores de expresión bacterianos incluyen, sin ser limitativos, a pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene), pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia) Los vectores de expresión eucariotas incluyen, sin ser limitativos, a pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia) Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro vector de clonación o expresión en la medida que sea replicable y viable en el huésped deseado Las regiones de promotor se pueden seleccionar de cualquier gen deseado utilizando vectores de expresión CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables Dos vectores apropiados son el pKK232-8 y el pCM7 Promotores bacterianos con nombres particulares incluyen a lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL y trp Los promotores eucariotas incluyen al CMV temprano inmediato, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-I de ratón La selección de un vector y un promotor adecuados está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte

Un vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción, un terminador de transcripción y secuencias adecuadas para amplificar la expresión Los vectores de expresión pueden contener un gen que confiera un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tal como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para un cultivo de células eucariotas, o tal como la resistencia a las tetraciclinas o la ampicilina para un cultivo de E coli

Bibliotecas

En una realización, se genera una biblioteca de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de los ácidos nucleicos y es codificada por una biblioteca genética vanegata. Puede producirse una biblioteca de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas tales que un conjunto degenerado de secuencias de aminoácidos variantes potenciales sea expresable como polipéptidos individuales, o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contengan el conjunto de secuencias en las mismas.

Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de ADN, y luego ligarse a un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias análogas potenciales. Se conocen en el arte métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (ver, por ejemplo, Narang, *Tetrahedron* 39 3 (1983), Itakura et al., *Annu Rev Biochem* 53 323 (1984), Itakura et al., *Science* 198 1056 (1984), Ike et al., *Nucleic Acid Res* 11 477, 1983).

Se conocen en el arte diversas técnicas para detectar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparados mediante mutaciones puntuales o truncamiento y para detectar bibliotecas de cADN para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para la detección rápida de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de la invención. Las técnicas más utilizadas, que se pueden adaptar al análisis de alto rendimiento para detectar grandes bibliotecas génicas, incluyen típicamente la clonación de la biblioteca génica a vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad

deseada facilite el aislamiento -del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó La mutagénesis de ensamblado recursivo (REM), una técnica que intensifica la frecuencia de los mutantes funcionales de las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de detección para identificar las variantes deseadas

Células huésped

La presente invención también proporciona células huésped que contienen los vectores descritos anteriormente La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura En forma alternativa, la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana

Las células huésped se pueden procesar mediante ingeniería genética (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores de clonación o expresión de la invención El vector puede encontrarse, por ejemplo, en forma de plásmido, de partícula viral o de fago Las células huésped tratadas mediante ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para la activación de los promotores o la selección de los transformantes La selección de las condiciones apropiadas de cultivo, tales como la temperatura y el pH, está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte

Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados se incluyen, sin ser limitativos, células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*, células fúngicas, tales como levaduras, células de insectos tales como la *Drosophila S2* y la *Spodoptera Sf9*, células de mamífero tales como las CHO, COS o de melanoma de Bowes La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de los expertos del arte a partir de las enseñanzas contenidas en la presente

La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse, por ejemplo, mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por Dextrano DEAE o por electroporación (Davis et al , BASIC METHODS IN MOLECULAR

BIOLOGY, 1986) Los constructos de las células huésped pueden usarse de modo convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante

Expresión de proteínas

Pueden expresarse proteínas maduras en células de mamífero, de levaduras, de bacterias o en otras células bajo el control de promotores apropiados. Pueden emplearse también sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas utilizando ARNs derivados de constructos de ADN de la presente invención. Se describen vectores de clonación y expresión adecuados para utilizar con huéspedes procariotas y eucariotas, según se mencionó anteriormente y en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, 2da Edition (Cold Spring harbor, N Y, 1989)

La transcripción de un ADN que codifica polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia amplificadora en el vector de expresión. Los amplificadores son elementos de ADN que actúan en forma cis, habitualmente de entre aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen al amplificador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pares de bases 100 a 270), a un amplificador del promotor temprano del citomegalovirus, a un amplificador de poloma del lado tardío del origen de replicación y a los amplificadores de adenovirus. Por lo general, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ej. el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural corriente abajo. Dichos promotores pueden derivar de operones que codifiquen enzimas glicolíticas tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor α , la fosfatasa ácida o las proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación y, con preferencia, con una secuencia líder capaz de dirigir la

secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. En forma opcional, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluya un péptido de identificación de aminoácidos N-terminales que imparta características deseadas, como por ej., la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Después de la transformación de una cepa adecuada del huésped y del crecimiento de la cepa del huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime por medios apropiados (por ej. cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan por un periodo adicional. Las células se cosechan típicamente por centrifugación y se desgarran por medios físicos o químicos. El extracto bruto resultante se conserva para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden desgarrarse por cualquier método conveniente, incluyendo los ciclos congelación-descongelación, la sonicación, la disrupción mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

Pueden utilizarse también diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteínas recombinantes. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen a las líneas COS-7 de los fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell* 23 175 (1981) y a otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, como, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y HBK.

Purificación de proteínas

Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos en el arte, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía sobre fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía sobre hidroxiapatita y la cromatografía de lectinas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse como paso final de purificación.

Los polipéptidos de la invención pueden aislarse convenientemente según se describe en los ejemplos específicos más adelante. Un polipéptido purificado tiene por lo menos aproximadamente un 70% de pureza, o sea que el polipéptido aislado está sustancialmente libre de material celular y tiene menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de material no-polipeptídico. Con preferencia, los preparados tienen una pureza de entre el 85% y el 99% (es decir, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 96, 97, 98 y 99%). La pureza de los preparados puede determinarse por cualquier medio conocido en el arte, tal como la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, espectrometría de masa y cromatografía líquida.

Modificación post-traducciona

Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la invención se pueden glicosilar con hidratos de carbono de mamíferos u otros eucariotas o pueden ser no-glicosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo inicial del aminoácido metionina.

Síntesis química

Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 - 2154, 1963; Roberge et al., Science 269, 202 - 204, 1995). La síntesis de polipéptidos puede realizarse utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). En forma opcional, los fragmentos de un polipéptido se pueden sintetizar separadamente y combinarse usando métodos químicos para producir una molécula de extensión completa.

Un polipéptido recién sintetizado puede purificarse en forma sustancial por medio de cromatografía líquida de alta resolución (ver, por ejemplo, Creighton, Proteins: Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). La

composición de un polipéptido sintético de la presente invención se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos, por ejemplo mediante el procedimiento de degradación de Edman (ver Creighton, mas arriba) Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias provenientes de otras proteínas para producir una variante de polipéptido o un polipéptido de fusión

Aplicaciones Farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo 2 (diabetes mellitus no-insulino dependiente) y/o evitar que los sujetos con intolerancia a la glucosa, intolerancia a la glucosa en ayunas, hipoglucemia y/u obesidad, desarrollen una diabetes de tipo 2

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden combinarse con un vehículo aceptable para uso farmacéutico para formar una composición farmacéutica para administración parenteral Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico Los vehículos aceptables para uso farmacéutico incluyen, pero sin ser limitativos, la solución salina, la solución salina bufferizada, la dextrosa, el agua, el glicerol, el etanol y sus combinaciones La formulación debe adaptarse a la modalidad de administración

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera conveniente, por ej., por vía oral, tópica, endovenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que resulte efectiva para el tratamiento y/o profilaxis de la indicación específica Las dosis adecuadas oscilan entre aproximadamente por lo menos 3,5 ng de polipéptido activo (es decir, sin incluir el peso de un resto de PEG o ácido graso)/Kg de

peso corporal y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 35 µg/kg (es decir, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg/kg) de peso corporal por día, teniendo en cuenta las vías de administración, síntomas, etc. Estos números no tienen en cuenta la biodisponibilidad del péptido in vivo, en cuyo caso puede usarse mayor o menor cantidad para alcanzar la dosis efectiva deseada. La determinación de una dosis está dentro de la capacidad común del experto del arte y requiere solo detección de rutina.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden emplearse en combinación con otros agentes farmacéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, la hiperglucemia y la obesidad. Los agentes apropiados incluyen a los secretagogos de insulina, los insulino-sensibilizantes y la metformina HCl.

La invención también provee envases o equipos farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Puede estar asociado al envase o equipo un aviso en forma prescripta por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de fármacos o productos biológicos y que refleje la aprobación por parte de la agencia.

Terapia génica

Un polipéptido de la invención también puede expresarse in vivo, lo cual con frecuencia se denomina "terapia génica". Así, por ejemplo, pueden obtenerse células mediante ingeniería genética con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifique el polipéptido ex vivo y luego administrarse esas células a un paciente para ser tratado con el polipéptido. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden obtener células mediante ingeniería genética por procedimientos conocidos en el arte usando una partícula retroviral que contenga un ARN que codifique los polipéptidos de la presente invención.

En una realización preferida, el ADN que codifica los polipéptidos de la invención se utiliza en terapia génica para trastornos tales como la diabetes. De acuerdo a esta realización, la terapia génica con el ADN que codifica los polipéptidos de la invención se provee a un paciente que la necesita en forma concurrente con o inmediatamente después del diagnóstico.

La administración local de polipéptidos que utiliza la terapia génica puede suministrar el agente terapéutico al área blanco, es decir el páncreas. Por ejemplo, se utilizó un promotor específico para crear un modelo de tumor pancreático en células beta de ratón (Hanahan, Nature 315 (6015) 115-22, 1985). Se consideran tanto metodologías de terapia génica in vitro como in vivo. Se conocen varios métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Ver, por ej., Mulligan, Science 260 926-31, 1993. Estos métodos incluyen

1) Transferencia directa de genes. Ver, por ej., Wolf et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science 247 1465-68, 1990,

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Ver, por ej., Caplen et al., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", Nature Med 3 39-46, 1995, Crystal, "The Gene As A Drug", Nature Med 1 15-17, 1995, Gao y Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", Biochem Biophys Res Comm 179 280-85, 1991,

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Ver, por ej., Kay et al., "In Vivo gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX Deficient Dogs", Science 262 117-19, 1993, Anderson, "Human Gene Therapy", Science 256 808-13, 1992.

4) Transferencia de ADN mediada por Virus del ADN. Dichos virus del ADN incluyen a los adenovirus (con preferencia los vectores basados en Ad-2 o Ad-5), los virus del herpes (con preferencia vectores basados en el virus del herpes simplex) y parvovirus (con preferencia vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no

autónomos, con mayor preferencia vectores basados en virus adeno-asociados y, por sobre todo, con mayor preferencia, vectores basados en AAV-2) Ver, por ej , Ali et al , "The Use Of DNA Viruses As vectors For Gene Therapy", Gene Therapy 1 367-84, 1994, Patente de los Estados Unidos 4 797 368 y Patente de los Estados Unidos 5 139 941

Sistemas de vectores para terapia génica

La elección de un sistema de vectores particular para transferir un gen de interés dependerá de una variedad de factores. Un factor importante es la naturaleza de la población celular blanco. Aunque los vectores retrovirales se han estudiado y usado extensamente en una cantidad de aplicaciones de terapia génica, estos vectores por lo general son inapropiados para infectar células que no están en división. Además, los retrovirus tienen una oncogenicidad potencial. Sin embargo, desarrollos recientes en el campo de los vectores lentivirales pueden evitar algunas de estas limitaciones. Ver Naldini et al , Science 272 263-7, 1996

El experto en el arte podrá apreciar que cualquier vector de terapia génica adecuado que codifique polipéptidos de la invención puede usarse de conformidad con esta realización. Son conocidas las técnicas para construir dichos vectores. Ver, por ej , Anderson, Nature 392 25-30, 1998, Verma y Somia, Nature 389 239-242, 1998. La introducción del vector al sitio blanco puede lograrse usando técnicas conocidas.

Los vectores de terapia génica adecuados incluyen a uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden utilizar incluyen, sin ser limitativos, a los promotores virales (por ej el LTR retroviral, el promotor SV40, el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor del virus sincitial respiratorio, el promotor del parvovirus B19 y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller et al , Biotechniques 7(9) 980-990, 1989), los promotores celulares (por ej los promotores de la histona, el polipéptido III y la R-actina) y los promotores inducibles (por ej el promotor MMT, el promotor de la metalotioneína y el promotor del choque térmico). La

selección de un promotor adecuado será evidente para aquellos con experiencia en el arte a través de las enseñanzas contenidas en la presente

Retro virus

Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivar los vectores de los plásmidos retrovirales mencionados anteriormente incluyen, sin ser limitativos, al Virus de la Leucemia Murina Moloney, el virus de la necrosis del bazo, los retrovirus tales como el Virus del sarcoma Rous, el Virus del Sarcoma Harvey, el virus de la leucosis de las aves, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de inmunodeficiencia humana, el Virus del Sarcoma Mieloproliferativo y el virus del tumor de mama. En una realización, el vector del plásmido retroviral se deriva del Virus de la Leucemia Murina Moloney.

El vector del plásmido retroviral se utiliza para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, sin ser limitativos, a las líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, según se describe en Miller, Human Gene Therapy, 15-14, 1990. El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en el arte. Dichos medios incluyen, sin ser limitativos, la electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con CaP04. En una alternativa, el vector del plásmido retroviral puede estar encapsulado en un liposoma o acoplado a un lípido y luego administrarse a un huésped. La línea celular productora genera partículas del vector retroviral que incluye a la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención. Luego dichas partículas de vector retroviral pueden usarse para transducir células eucariotas, ya sea in vitro o in vivo. Las células eucariotas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención. Las células eucariotas que se pueden transducir incluyen, sin ser limitativos, las células germinales embrionarias, las células de carcinoma embrionario como así también las células germinales hematopoyéticas, los hepatocitos, los fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células del epitelio bronquial.

Adenovirus y virus adeno-asociados

Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células en reposo o diferenciadas en forma terminal, tal como las neuronas o hepatocitos y parecen ser esencialmente no-oncogénicos. Ver, por ej., Ali et al., 1994, en la página 367. Los adenovirus no parecen integrarse al genoma del huésped. Dado que existen fuera del cromosoma, se reduce notoriamente el riesgo de mutagénesis insercional. Ali et al., 1994, en la página 373.

Los virus adeno-asociados exhiben ventajas similares a las de los vectores de base adenoviral. Sin embargo, los AVVs exhiben una integración sitioespecífica en el cromosoma humano 19 (Ali et al., 1994, en la página 377).

Terapia transcanónica

Una aproximación diferente a la terapia génica es la "terapia transcanónica", en la cual las células del paciente se tratan ex vivo para inducir a los genes latentes a producir la proteína de interés después de su reintroducción al paciente. La terapia transcanónica supone que el individuo tiene un complemento normal de genes necesarios para la activación. La terapia transcanónica implica introducir un promotor u otra secuencia regulatoria exógena capaz de activar los genes latentes en el ADN cromosómico de las células del paciente ex vivo, cultivar y seleccionar las células activas productoras de proteína y luego reintroducir las células activadas en el paciente con el propósito de que se tomen luego totalmente establecidas. Las células "con genes activados" fabrican luego la proteína de interés durante algún tiempo significativo, tal vez tanto como la vida entera del paciente. Las Patentes de los Estados Unidos Nos 5 641 670 y 5 733 761 describen en detalle este concepto.

Con el fin de que esta invención sea mejor entendida, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo a los propósitos de ilustración, y no han de considerarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención. Todas las

patentes, solicitudes de patente y referencias citadas en esta presentación se incorporan a la misma a modo de referencia en su totalidad

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Metodología de síntesis de péptidos

Se siguió el siguiente procedimiento general para sintetizar algunos de los polipéptidos de la invención. Se llevó a cabo la síntesis de péptidos por medio de la estrategia FMOC/ter-Butil (Peptide synthesis Protocols (1994), Volumen 35, por Michael W. Pennington & Ben M. Dunn) en condiciones de flujo continuo utilizando resinas PEG-Poliestireno Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubingen, Alemania). Al completarse la síntesis, los péptidos se separaron por ruptura de la resina y se desprotegieron usando TFA/DTT/H₂O/Trisopropil silano (88/5/5/2). Los péptidos se precipitaron del cóctel de ruptura utilizando dietil éter frío. El precipitado se lavó tres veces con el éter frío y luego se disolvió en ácido acético 5% antes de someterse a liofilización. La identidad de los péptidos se confirmó mediante cromatografía en fase reversa sobre una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) sobre un sistema Waters ALLIANCE (Waters Corporation, Milford, MA) utilizando agua/acetonitrilo con TFA 3% como gradiente desde acetonitrilo 0% hasta 100%, y mediante espectrometría de masa MALDI en un Espectrómetro de Masa VOYAGER DETM MALDI (modelo 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Se agregó la muestra del péptido en buffer de Matriz (d H₂O/acetonitrilo 50/50 con 3% de TFA) a buffer de Matriz 1/1. Aquellos péptidos que no reunieron el criterio de pureza de >95% se purificaron mediante cromatografía en fase reversa sobre un sistema de HPLC Waters Delta Prep 4000 (Waters Corporation, Milford, MA).

Ejemplo 2

Clonación de péptidos

Para establecer un método sólido para expresar los polipéptidos de la invención y sus mutantes, se clonaron las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de manera C-terminal a GST con un único sitio de reconocimiento del Factor Xa separado del péptido monomérico y el GST. El gen que codifica el sitio de reconocimiento del Factor Xa fusionado a la secuencia de ADN del péptido a producir se ha sintetizado por hibridación de dos fragmentos de ADN mono-hebra superpuestos (70-90meros) conteniendo un sitio de enzima de restricción BamHI o EcoRI inmediatamente 5' a la secuencia de ADN del polinucleótido a clonar, seguido de síntesis de ADN de las hebras opuestas a través del gran fragmento de la ADN polimerasa I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD).

La secuencia de ADN elegida para cada polinucleótido se basó en la traducción reversa de la secuencia de aminoácidos designada de cada péptido. En algunos casos, el polinucleótido que codifica al péptido se genera por mutagénesis de PCR (Picard et al., Nucleic Acids Res 22: 2587-91, 1994; Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) de un polinucleótido ya preparado por el método descrito anteriormente. El producto de doble hebra se digiere luego por medio de BamHI y EcoRI y se liga al pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech), que también se ha obtenido por ruptura con BamHI y EcoRI.

Por ejemplo, cuando la secuencia de ADN del polipéptido identificado como SEC ID NO 7 se clona en el pGEX-6P-1, se expresó la siguiente secuencia de polipéptido en forma de fusiones con glutathione S-transferasa (GST): IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 33), en la cual los primeros 4 aminoácidos, IEGR, son el sitio de reconocimiento del factor Xa y los restantes 31 aminoácidos son la secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID NO 7.

Los primeros y últimos seis nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico que codifica al polipéptido identificado como SEC ID NO 7, representan los sitios de la enzima de restricción (BamHI y EcoRI) utilizados para la clonación al plásmido pGEX-

6P-1 (FIG 1) La secuencia "TAATGA" que precede inmediatamente al sitio EcoRI ("GAATTC") codifica dos codones de terminación. El resto de la secuencia de ADN codifica el Factor Xa-polipéptido identificado como secuencia de fusión de SEC ID NO 7

Ejemplo 3

Expresión recombinante de péptidos y purificación

Células BL21 (DE3) (Stratagene) transformadas con un péptido GST de fusión que contenía plásmidos, se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una D₀₆₀₀ de entre 0,6 y 1,0 y se indujeron mediante IPTG (Life Technologies) 1 mM durante 2 horas a 37°C. Se centrifugaron dos litros de células a 7 700xg durante 15 minutos y se conservaron a -20°C. El pellet de células se resuspendió en 80 ml de reactivo para extracción de proteínas bacterianas B-PER (Cat No 78248, Pierce) e Inhibidor de Proteasas Completo (Roche) 1x hasta que la suspensión de células se homogenizó. La mezcla homogénea se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron lisosoma y Dnasa I hasta una concentración final de 200 µg/ml y 10 µg/ml para solubilizar más las proteínas y para reducir la viscosidad, respectivamente. La mezcla se incubó durante 5 minutos adicionales. Los restos de células se eliminaron por centrifugación a 27 000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con 2 mL de resina Glutaton Sefarosa 4B (Pharmacia) en un agitador durante toda la noche a 4°C. La resina se separó por centrifugación a 1 500 g durante 15 minutos, se rellenó en Columnas de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad), se lavó con 30 mL de PBS seguido de 10 mL de buffer de Factor Xa (CaCl₂ 1 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Los péptidos se separaron de la columna con 60 unidades de Factor Xa (Pharmacia) en 1 mL de buffer de Factor Xa, durante toda la noche a 4°C. Estos eluatos se corrieron luego en HPLC de C18 (Beckman System Gold) usando un bucle de 2 mL y un caudal de flujo de 1 mL/minuto con el siguiente programa: 5 minutos de Buffer A (TFA/H₂O 0,1%), 30 minutos de gradiente hasta 100% de Buffer B (TFA/ACN 0,1%), 10 minutos de Buffer A, 10 minutos de gradiente y 10 minutos de Buffer A. Las fracciones correspondientes a los picos (0,5 mL cada una) se recogieron y separaron mediante

electroforesis en gel de Tricine-SIDS 10-20% La identidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masa utilizando la masa predicha a partir de la secuencia de aminoácidos Los rendimientos típicos son de aproximadamente 50 µg de péptidos libres por litro de cultivo de E coli Se ha demostrado que los péptidos recombinantes tienen las mismas actividades que sus versiones sintéticas

La siguiente tabla, Tabla 2, contiene algunos polipéptidos preparados de conformidad con el protocolo de síntesis de péptidos discutido más arriba (Ejemplo 1) o, en forma recombinante como se describió anteriormente

Tabla 2

Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEC ID NO 1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 7)

G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 8)
G56	HSQGTFTSDYAAYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLDAKKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDAKKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAKKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDAKKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 14)
G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 115)
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG (SEC ID NO 16)
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG (SEC ID NO 17)
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGCG (SEC ID NO 18)
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (SEC ID NO 19)
G277	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (22 kD) (SEC ID NO 20)

G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG (SEC ID NO 21)
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLRGRG (SEC ID NO 22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEC ID NO 23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEC ID NO 24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLRGRC (SEC ID NO 25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLRGRC (22kD) (SEC ID NO 26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLRGRC (43kD) (SEC ID NO 27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEC ID NO 29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVRGRG (SEC ID NO 30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLRGRGK(FA) (SEC ID NO 31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVRGRG (SEC ID

	NO 32)
--	--------

(FA) palmitato C₁₆ unido al residuo de lisina

(22kD) PEG de 22kD unido al residuo de cisteína

(43kD) PEG de 43kD unido al residuo de cisteína

Ejemplo 4

Preparación de membranas de células RINm5F

Matraces conteniendo células RINm5F se lavaron con PBS, se disgregaron en un buffer Hepes 20 mM-EDTA 1 mM-sacarosa 250 mM conteniendo inhibidores de proteasas (HES) y se homogeneizaron en un homogeneizador dounce, seguido de resuspensión repetida a través de una aguja de medida 23

Las células y núcleos intactos se eliminaron por centrifugación a 500xg durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23 y se repitió la centrifugación. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se combinaron y se centrifugaron a 40 000xg durante 20 minutos. El pellet de membranas plasmáticas resultante se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23, seguida de una aguja de medida 25. Las membranas se conservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Ejemplo 5

Preparación de membranas plasmáticas de hígado de rata

Se sacrificaron ratas y se extrajeron sus hígados colocándolos en buffer TES (Tns 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, sacarosa 255 mM conteniendo inhibidores de proteasas) enfriado con hielo. Se determinó el peso húmedo de los hígados y se molió el tejido en 5 volúmenes de buffer TES enfriado con hielo y se preparó una suspensión

utilizando un polítron. Todos los buffers y agitadores se conservaron a 4°C. La suspensión se homogenizó adicionalmente usando tres golpes de un homogeneizador dounce manual. El homogenato se pasó a través de varias capas de estopa y se centrifugó a 25 000 x g durante 10 minutos. Los pelets se homogeneizaron en 22,1 ml de buffer TES utilizando 10 golpes de un homogeneizador dounce manual. Se agregaron veintisiete mililitros y nueve décimas de sacarosa 2,4 M en TE y se mezcló bien. El homogenato se distribuyó en varios tubos y cada tubo se cubrió con 7 ml de buffer TES. Los tubos se centrifugaron a 120 000 x g durante 60 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la interfase que se formó durante el centrifugado, se diluyeron en TES y se concentraron usando una centrifugación de 15 minutos a 200 000 x g. El pelet resultante se homogeneizó otra vez en 9,8 ml de buffer TES, se combinó con 10,3 ml de sacarosa 2,4 M, se cubrió con 7 ml de TES y se centrifugó a 180 000 x g durante 30 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la interfase, se diluyeron con TES y se recogieron por centrifugación a 200 000 x g durante 15 minutos. El pelet final se resuspendió en TES. Las membranas plasmáticas se conservaron a -80°C hasta estar listas para su uso.

Ejemplo 6

Preparación de hepatocitos de rata

Se aislaron hepatocitos de acuerdo con un procedimiento modificado de Berry y Friend (J Cell Biol. 43:506, 1969). Se anestesió con pentobarbital sódico (55 mg/kg, i.p.) una rata Wistar macho. La rata se colocó sobre su lomo en la bandeja del aparato de perfusión hepática (37°C) y sus miembros se aseguraron con cinta de laboratorio. La superficie ventral se limpió con alcohol 70% y la cavidad abdominal se abrió con tijeras para exponer el hígado, la vena porta, la arteria hepática y la vena cava posterior. Se colocaron ligaduras holgadas alrededor de los tres vasos. Se insertó una cánula en la vena porta y se aseguró con la ligadura. La arteria hepática y la vena cava posterior por debajo del hígado se ataron con las ligaduras. La bomba de perfusión se encendió y la aorta descendente se seccionó inmediatamente para permitir que el buffer escapara y se desangrara la rata. La cavidad torácica se abrió rápidamente para exponer el

corazón Se insertó una cánula en la vena cava superior a través del corazón y se aseguró con una ligadura para completar la circulación del buffer a través del hígado El hígado se perfundió con buffer Krebs-Henseleit conteniendo 5 - 10% de RBC de oveja y bajo un caudal constante de 95% de O₂/5% de CO₂ in situ con un caudal de 14 ml/minuto Se perfundió en un sistema no circulante durante 5 minutos y luego se continuó con un sistema de recirculación (con 30 mg de colagenasa) durante otros 30 minutos Luego se extrajo el hígado, se molió con tijeras en un vaso de plástico y se filtró a través de un tamiz de nylon Los hepatocitos se separaron del material de desecho mediante una serie de lavados con buffer y centrifugaciones (690 rpm, temperatura ambiente, 90 segundos) Se diluyó con buffer una alícuota de células, se tiñó con Trypan Blue 0,4% y se hizo un recuento El resto de las células se diluyó con buffer hasta una densidad apropiada para cada ensayo

Ejemplo 7

Protocolo para aislamiento de islotes de rata

Se usaron ratas Sprague Dawley (275-320 g) como fuente donante de islotes En resumen, el páncreas se llenó con 10 ml de Liberase RI (Boehringer Mannheim) reconstituida, se cosechó y se incubó con 5 ml adicionales de solución enzimática en un baño de agua durante 30 minutos La suspensión de tejido se lavó dos veces con buffer FBS/Hanks (Gibco) 10% frío, se resuspendió en 8 ml de ficoll 25% (Sigma) y luego se dispuso en capas de 5 ml cada una de ficoll 23%, 20% y 11 % Los islotes de la capa de 20% después de la centrifugación se retiraron, se lavaron dos veces con buffer FBS/Hanks 10% frío y se resuspendieron en medio FBS/RPMI 10% (Sigma)

Ejemplo 8

Unión competitiva del péptido al receptor del GLP-1 en membranas plasmáticas de células RINm5F

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del GLP-1 en membranas de RINm5F están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 20 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nM) Los valores de IC_{50} para los derivados de polipéptidos de la invención están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 500 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 nM)

La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de células RINm5F se midió de la siguiente manera Se bloquearon placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml Se aplicaron a cada pocillo cinco microgramos de membranas plasmáticas de células RINm5F diluidas en buffer de unión junto con GLP-1 marcado con ^{125}I de 0,05 μ Ci y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism para determinar los IC_{50} Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del GLP-1 presente en las membranas plasmáticas aisladas de células RINm5F con valores de IC_{50} de entre 1,4 nM y 248 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos) IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del GLP-1 (7-36) (SEC ID NO 2) marcado se reduce en un 50%

Ejemplo 9

Unión competitiva del péptido al receptor del glucagon en membranas plasmáticas de hígado de rata

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del glucagon en membranas de hígado de rata están típicamente al menos entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1000 nM (es decir, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 nM) La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de hígado de rata se midió de la siguiente manera Se bloquearon placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml Se aplicaron a cada pocillo tres microgramos de membranas plasmáticas de hígado de rata diluidas en buffer de unión junto con glucagon marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism para determinar los IC_{50} Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del glucagon presente en las membranas plasmáticas aisladas de hígado de rata con valores de IC_{50} de entre 11,7 nM y 726 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos) IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del glucagon marcado se reduce en un 50%

Ejemplo 10

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del GLP-1 utilizando el ensayo de proximidad por centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 o 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 4% y aproximadamente 1000% (es decir, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000%) Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 o 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(736) (SEC ID NO 2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 0,5% y aproximadamente 1000% (es decir, 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000%) La "potencia relativa" es la EC_{50} del GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) nativo dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado por 100 "EC₅₀" es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima

La señalización de péptidos del receptor del GLP-1 para algunos polipéptido de la invención utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del CAMP, se midió de la siguiente manera Se plaquearon células RINm5F en placas de 96 pocillos (Costar) a razón de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo y se cultivaron a 37°C durante 24 horas en RPMI 1640, FBS 5%, antibiótico/antimicótico (Gibco BRL) El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS Las células se incubaron con concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M en HEPES-PBS que contenía BSA 1% e IBMX 100 μ M durante 15 minutos a 37°C Para probar los péptidos conjugados con ácido graso, se omitió el BSA del buffer de incubación Se retiró el buffer de incubación y las células

se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del Ensayo de Proximidad por Centelleo del CAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) La cantidad de CAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con el equipo

La cantidad de CAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prizm APRA determinar la EC_{50} para cada péptido El valor de potencia relativa promedio para la activación del receptor del GLP-1 para los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 estuvo entre el 0,6% y el 76,1% La máxima actividad inducida osciló entre el 83% y el 132% del péptido nativo GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos) Ver la Tabla 4

Ejemplo 11

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del glucagon utilizando el ensayo de proximidad por Centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagon en un ensayo de proximidad por Centelleo del CAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 75% (es decir, 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, o 75%) de la máxima actividad inducida por el glucagon nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 5% (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4 o 5%) Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagon en un ensayo de proximidad por Centelleo del CAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 40% (es decir, 0, 1, 10, 20, 30 o 40%) de la máxima actividad inducida por el glucagon nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente un 0,001 y aproximadamente un 1 % (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 %) La "potencia relativa" es la EC_{50} del glucagon nativo (SEC ID NO 1) dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado

por 100 " EC_{50} " es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima

La señalización de péptidos del receptor del glucagon para algunos polipéptidos de la invención utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del cAMP, se midió de la siguiente manera. Se plaquearon hepatocitos de ratas aislados recientemente en placas de 96 pocillos a razón de $7,5 \times 10^4$ o 2×10^5 células/pocillo en Hepes-bicarbonato que contenía 1 % de BSA e IBMX 100 μ M. Luego del equilibrado a 37°C en un medio de 5% de CO_2 /95% de O_2 durante 10 minutos, se agregaron péptidos en concentraciones que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M durante otros 15 minutos. Las placas se centrifugaron brevemente, se retiró el buffer de incubación y las células se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del Ensayo de Proximidad por Centelleo del cAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ).

La cantidad de cAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con este equipo. La cantidad de cAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism APRA determinar la EC_{50} para cada péptido. El valor de potencia relativa promedio (relación entre la concentración del glucagon y la concentración del polipéptido para una respuesta del 50% (EC_{50}) $\times$ 100, determinado a partir de un mínimo de tres ensayos) para la activación del receptor del glucagon para los polipéptidos de la invención fue $<5\%$. La máxima actividad inducida osciló entre el 28,3% y el 71,3% del péptido nativo glucagon (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos).

La capacidad del péptido híbrido para inhibir la actividad del glucagon se midió de la siguiente manera. Luego del equilibrado a 37°C en un medio de 5% de CO_2 /95% de O_2 durante 10 minutos, se agregó péptido 10 VM a las células, seguido inmediatamente de una concentración submáxima de glucagon durante 15 minutos. Luego las células se lisaron y se determinó el cAMP como se describió anteriormente.

Luego de restar la cantidad de cAMP producida en los hepatocitos no estimulados de cada punto tomado como dato, se calculó la inhibición porcentual de la siguiente manera la inhibición porcentual es la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagon submáximo sólo menos la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagon submáximo y péptido 10 uM, dividido por la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagon submáximo solo, y multiplicado por 100 La inhibición porcentual promedio de la actividad del glucagon por parte de los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 se ubicó entre el 11,3% y el 59% (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos) Ver la Tabla 4

Ejemplo 12

Medición de la liberación de glucosa de hepatocitos de rata

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagon, medida por la liberación de la glucosa de hepatocitos de rata, se ubica típicamente al menos entre aproximadamente un 20% de inhibición y aproximadamente un 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%)

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagon por parte de algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera Se agregaron hepatocitos de rata a una placa de fondo plano de 96 pocillos (2×10^5 /100 [il/pocillo) y se pre-incubaron en una incubadora a 37°C con agitación constante y bajo un flujo de 95% de O_2 /5% de CO_2 durante 10 minutos Los hepatocitos se incubaron durante otros 30 minutos después del agregado de glucagon con o sin péptido Las células se lisaron luego con ácido perclórico 15% y las placas se centrifugaron a 2600 rpm, a 4°C durante 15 minutos El sobrenadante se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 8,0) KOH 2,5 N (45 55) y se centrifugó otra vez. En el sobrenadante resultante se analizó la glucosa con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Methods of Enzymatic análisis, H U Berneyer, Ed , Academic Press) y se leyó la A340 en un lector de placas fMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)

La liberación de glucosa se calculó después de restar la cantidad de glucosa producida en el hepatocito no estimulado de cada punto tomado como dato y se calculó la inhibición porcentual. La inhibición porcentual es la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagon 1 nM sólo menos la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagon 1 nM y péptido 100 nM, dividido por la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagon 1 nM solo, y multiplicado por 100. El polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 inhibió la producción de glucosa mediada por glucagon en un 47%, según se determinó en 3 ensayos. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 13

Medición de la secreción de insulina por islotes de ratas perfundidas

El incremento de la secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de los islotes perfundidos al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1, 5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10 veces).

La secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas mediada por algunos péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Las respuestas bifásicas de la liberación de insulina estimulada por estos polipéptidos se ensayaron mediante la perfusión de los islotes. Se cargaron cincuenta islotes en la cámara de perfusión y se perfundieron con HEPES-KRB que contenía glucosa 3 mM a 37°C. Después de 60 minutos, los islotes se expusieron a un buffer que contenía glucosa 8 mM con o sin péptido (50 nM) y se perfundieron durante otros 30 minutos. Las fracciones del perfusato se recogieron a intervalos de 1 a 5 minutos para la determinación de la insulina. La insulina se midió utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics, Windham, NH). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 incremento la secreción de

insulina de los islotes perfundidos aproximadamente 2 veces, que es equivalente a lo logrado por el GLP-1 50 nM

Ejemplo 14

Secreción de insulina de células dispersas de islotes de rata

El incremento de la secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas, en este ensayo, es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de células dispersas de islotes al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10 veces).

La secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas mediada por una cantidad de péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Se aislaron islotes de Langerhans de ratas SD (200-250 g) a través de un procedimiento de digestión que utiliza colagenasa. Las células dispersas de los islotes se prepararon mediante tratamiento con tripsina, se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de V y se peletizaron. Las células se cultivaron durante toda la noche en un medio. El medio se aspiró y las células se preincubaron con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía glucosa 3mM durante 30 minutos a 37°C. El buffer de preincubación se retiró y las células se estimularon con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía la concentración de glucosa adecuada (por ej. 8 mM), con y sin péptidos, durante un tiempo adecuado a 37°C. En algunos estudios, también se incluye una concentración apropiada de GLP-1. Se retiró una porción de sobrenadante y se midió su contenido en insulina por medio de SPA. Los resultados se expresan como factor por encima del control (FOC). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 27 incrementó la secreción de insulina de las células dispersas de los islotes en aproximadamente 3 veces. Ver Tabla 2.

Ejemplo 15

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagon en ratas Wistar alimentadas

La inhibición de la producción de glucosa estimulada por glucagon en este ensayo es una inhibición de por lo menos el 20%. El componente antagonista del receptor del glucagon de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagon, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagon en ratas Wistar alimentadas, en al menos una inhibición entre el 20% y aproximadamente el 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%)

La producción de glucosa estimulada por glucagon en ratas Wistar alimentadas por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. Se anestesiaron por un breve lapso ratas Wistar macho con gas isoflurano, se les extrajo sangre de la cola para medir la glucemia utilizando un Glucometer y luego se les aplicó una inyección en la vena de la cola de cada vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%), 0,29 nmol/kg de glucagon, 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención o glucagon + polipéptido de la invención. Se retiró la anestesia y a las ratas conscientes se les extrajo sangre nuevamente después de 10, 20 y 30 minutos.

Se determinó la inhibición de la glucosa analizando el área bajo la curva de glucosa después de restar el nivel de glucosa basal (dABC). La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagon sólo menos la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagon en presencia de 1 nmol/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagon solo, y multiplicado por 100.

El glucagon solo elevó los niveles de glucosa sanguínea mientras que los polipéptidos de la invención sólo no tuvieron efecto sobre los niveles de glucosa sanguínea. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en

SEC ID NO 6 inhibió la elevación de la glucosa sanguínea mediada por glucagon en un 63% Ver la Tabla 2

Ejemplo 16

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagon en ratones Balb1C alimentados

La inhibición de la producción de glucosa en este ensayo es una inhibición de por lo menos aproximadamente el 20%. Con preferencia, el componente antagonista del receptor del glucagon de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagon en ratones, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagon en ratones Balb/C alimentados, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100% (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%)

La producción de glucosa estimulada por glucagon en ratones Balb/C alimentados por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. A ratones Balb/C machos se les suministró vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%) o 100 µg/kg de polipéptido denvatizado por inyección subcutánea 17 horas antes de la provocación con glucagon. Al día siguiente los ratones se sometieron a ayuno durante 2 horas antes de recibir una inyección endovenosa de 10 µg/kg de glucagon o vehículo en la vena de la cola. Se extrajo a los ratones sangre de la cola para la determinación de glucosa utilizando un Glucometer justo antes de la inyección de glucagon y nuevamente 15 minutos después.

Se calculó el cambio en la glucosa luego de los 15 minutos para cada ratón. Luego el cambio promedio en la glucosa del grupo tratado con vehículo se restó del cambio en la glucosa para cada ratón en los grupos tratados para obtener el cambio en la glucosa debido al glucagon. La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 10 µg/kg de glucagon sólo menos la cantidad de glucosa producida por µg /kg de glucagon en presencia de 100 g/kg de péptido híbrido, dividido

por la cantidad de glucosa producida por 100 µg/kg de glucagon sólo, y multiplicado por 100 Ver la Tabla 3

Tabla 3

	Glucosa (mg/dl)					
Grupo	0 min	15 min	Delta (15-0)	- Vehículo Delta	% de 10 µg/kg de glucagon	% de inhibición
vehículo	92	108	16			
10 µg/kg de glucagon	95	195	100	84	100	
10 µg/kg de glucagon + 100 µg/kg de polipéptido (SEC ID NO 27)	75	150	75	59	69	31

Ejemplo 17

Medición de los aumentos en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa in vivo (IVGTT) en ratas Wistar sometidas a ayuno

Un aumento en los niveles plasmáticos de insulina en este ensayo es de por lo menos un factor 2 Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la inyección aumenta la secreción de insulina en ratas, según se mide a través de un aumento en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa in vivo en ratas Wistar sometidas a ayuno, en un factor entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, con mayor preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, y , con mayor preferencia aun, entre

aproximadamente 2 y aproximadamente 20 (es decir, en un factor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20)

Los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar sometidas a ayuno por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera. Ratas Wistar macho se sometieron a ayuno durante toda la noche y luego se anestesiaron con gas isoflurano. A las ratas se les aplicó una inyección en la vena de la cola de 0,4 g/kg de glucosa más vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%) 61 nmol/kg de GLP-1 (control positivo) 61 nmol/kg de polipéptidos de la invención. Se extrajo sangre del ojo de las ratas un minuto después y se determinó la insulina en el plasma utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics (Windham, NH)). A una concentración de 1 nmol/kg, el polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 promovió la secreción de insulina en un factor 34, lo cual es equivalente al logrado por 1 nmol/kg de GLP-1. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 18

Efecto de los péptidos de la invención en el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratas o ratones

Una disminución en los niveles de glucosa sanguínea medidos en este ensayo es una disminución de por lo menos aproximadamente un 10%. Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención disminuye los niveles de glucosa sanguínea, según se mide a través del ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratas o ratones, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 60%, con mayor preferencia entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 80%, y, con mayor preferencia aun, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 100% (es decir, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%).

Los niveles de glucosa sanguínea durante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera. Se examinó en ratos o ratones la actividad in vivo de los polipéptidos de la invención cuando se los administra en forma subcutánea. Las ratas o ratones mantenidos en ayunas toda la noche recibieron una inyección subcutánea de control o péptido (100 g/kg). Se midió la glucosa sanguínea basal antes de la administración de los péptidos o tres o 17 horas después de la administración de los péptidos derivatizados, y las ratas o ratones recibieron 2 g/kg de glucosa en forma intraperitoneal. Se midió la glucosa sanguínea otra vez después de 15, 30 y 60 minutos en ratas o después de 30 y 60 minutos en ratones.

Los péptidos de la invención redujeron en forma significativa los niveles de glucosa sanguínea con respecto al vehículo luego del IPGTT, con una reducción del 13%-54% en el ABC de la glucosa. Esto demuestra que los péptidos tienen una prolongada actividad depresora de la glucosa y una prolongada vida media in vivo. El GLP-1 tiene una vida media muy corta in vivo (< 10 min). La capacidad de los péptidos de la invención para disminuir la glucosa sanguínea 3 horas después de la administración del péptido es una clara indicación de que el péptido está presente en la circulación en este instante y por ello tiene una prolongada vida media respecto del GLP-1.

Ejemplo 19

Incorporación de PEG a los péptidos

La incorporación de PEG puede efectuarse por cualquier método conocido por los expertos en el arte. Sin embargo, en esta instancia, la incorporación de PEG se llevó a cabo introduciendo una única mutación de cisteína en el péptido seguido de incorporación del PEG a la cisteína por medio de un enlace tioéter estable entre el sulfhidrilo del péptido y el grupo maleimida del reactivo metoxiPEG-maleimida (Inhale/Shearwater). Es preferible introducir la única cisteína en el extremo C-terminal.

del péptido para minimizar la potencial reducción de la actividad por incorporación del PEG

Específicamente, se agregó un exceso molar de 2 a 1 de reactivo mPEGmal (PM 22 kD y 43 kD) a 1 mg de péptido (por ej SEC ID NO 25 con una mutación de cisteína en el extremo C-terminal del péptido) y se disolvió en buffer de reacción a pH 8 (fosfato de Na 0,1 M/ NaCl 0,1 M/ EDTA 0,1 M) Después de 0,5 horas a temperatura ambiente, la reacción se frenó con un exceso doble de moles de DTT o de cisteína libre respecto del mPEG-mal La mezcla de reacción péptido-PEG-mal se aplicó a una columna de intercambio catiónico para eliminar los reactivos de PEG residuales seguido de una columna de gel filtrante para eliminar el péptido libre residual Se determinaron la pureza, la masa molecular y el número de sitios con PEG incorporado por medio de SIDS-PAGE y espectrometría de masa MALDI-TOF La incorporación de PEG con un PEG de menor tamaño (por ej un PEG de 22 kD lineal) reducirá la actividad del péptido con menor probabilidad mientras que un PEG de mayor tamaño (por ej un PEG de 43 kD ramificado) reducirá la actividad con mayor probabilidad Sin embargo, el PEG de mayor tamaño incrementará la vida media plasmática en mayor medida de modo que sea posible una inyección una vez a la semana (Harms, et al , PEGylation A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics, Clin Pharmacokinet 40 539-551, 2001)

Ejemplo 20

Potencia relativa de los polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagon

La unión del GLP-1 (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 8 Los valores de potencia relativa y de actividad porcentual del GLP-1 se calcularon como se describe en el Ejemplo 10 Se suministró a ratas o ratones 100 g/kg de péptido y a las 3 horas posteriores a la dosificación se determinó la disminución de los niveles de glucosa mediante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT), según se describe en el Ejemplo 18 Ver la Tabla 4

La unión a las membranas hepáticas (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 9 La inhibición porcentual del aumento del CAMP estimulado por glucagon se determinó como se describe en el Ejemplo 11 Se suministró a ratas o ratones 100 g/kg de péptido y a las 17 horas posteriores a la dosificación se determinaron los niveles de glucosa mediante los métodos de los Ejemplos 15 y 16 y que se informan en la tabla 4 Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon in vivo

Péptido	GLP-1				Glucagón		
	IC50 de RIN (nM)	Potencia Relativa (%)	% GLP-1 máx	Disminución de ABC en IPGTT in vivo (%) ^a	IC50 de Hígado (nM)	%de Inhib del aumento del cAMP estimulado por glucagón	%de disminución de la glucosa sanguínea estimulada por glucagón ^b
Glucagón					1,8		
GLP-1	0,4	100	100				
G1	6	6,9	112,1		6,6		
G5	0,5	69,9	109,4		243,1		
G27	2,2	13,4	98,1		69,3	31	
G51	8,2	58,1	91,2		154,1	35,2	
G55	9,8	18,6	115,9		139,2	32,1	
G56	6,6	37,2	114,8		125,3	28,6	
G57	14,7	18,3	132,4		177,5	18,4	
G58	6,9	76,1	99,0		163,5	32,6	
G59	2,1	22,7	101,7		97,5	41,1	
G60	13,8	22,3	95,7		682	21,8	
G61	10,6	12,1	96,0		232	45,2	
G71	5,8	4,3	93,3		25,6	11,3	
G74	4,4	8,4	88,7		21,7	23,7	
G75	7,7	6,6	86,1		54,0	17,1	
G76	10,2	7,7	85		59,1	23,0	
G77	8,9	9,5	92,1		61,1	18,6	
G277	ND	1,8	93,7	46	63,5		
G82	8,1	29,9	97,1		33,6	30,2	
G83	3,2	29,9	89,4		28,6	24,7	
G84	1,4	61,8	113,9		11,7	25,2	
G85	1,5	64,5	95,8		16,1	27,9	
G185	4,5	13,0	103,9		48	32	
G2185	56,1	6,2	112,7	44	347		
G4185	248	0,7	96,3	36	547		31
G87	98,6	6,1	100,4	13	620	59	
G88	109,0	2,3	118,3	16	350		
G90	25,4	0,8	83,5	13	726		
G182	12,6	1,4	104,4	14	220		
G183	158,7	0,6	90,5	27	663		

a = IPGTT en ratones 3 horas posteriores a la dosificación con 100 g/kg de péptido

**b = provocación con glucagon en ratones 17 horas posteriores a la dosificación
con 100 g/kg de péptido**

ND = no determinado

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pan, Clark

<120> Péptidos que actuan como agonistas del receptor GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y sus métodos de uso farmacológico

<130> 2973 00085

<160> 34

<170> PatentIn versión 3 1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOU_RES

<222> (30) (30)

<223> AMIDACIÓN

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

<210> 3

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30) (30)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 4

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30) (30)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<900> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD RES
<222> (30) (30) <223> AMIDACIÓN

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 12
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

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

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

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

<210> 15

<211> 31 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 17
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Cys Arg Gly
20 25 30

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Cys Gly
20 25 30

<210> 19
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 20
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) (31)
<223> Incorporación de PEG

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 21
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 21
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

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

<210> 22
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 22

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

<210> 23
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 23

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

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 24

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

<210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
 20 25 30

<210> 26
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) (31)
<223> Incorporación de PEG

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
 20 25 30

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) (31)
<223> Incorporación de PEG

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala

1	5	10	15
Arg	Arg	Ala	Arg
	Glu	Phe	Ile
	Lys	Trp	Leu
	Val	Arg	Gly
	Arg	Cys	
	20	25	30

<210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30) (30)
 <223> AMIDACIÓN

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (20) (20)
 <223> PALMITATO

<400> 28

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ala
1				5					10					15	

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

<210> 29
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (31) (31)
 <223> PALMITATO

<400> 29

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ala
1				5					10					15	

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

<210> 30
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (24) (24)
 <223> PALMITATO

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

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

<210> 31
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (32) (32)
 <223> PALMITATO

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

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

<210> 32
 <211> 31

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (24) (24)
 <223> PALMITATO

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 33

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

Gly Arg Gly
 35

<210> 34
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (11) (12)
<223> X11 = R, G, S, A, K ó T
X12 = K, N, R, A, S, H ó Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16) (18)
<223> X16 = A, F, S, W, T, H, K, R, V, I, L, M, N, Q, G ó Y
X17 = R, A, L, M, V, Q, K, F, I, W, N, D, E, H, S, T, G ó Y
X18 = K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G ó H

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Xaa Xaa Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

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

REIVINDICACIONES

1 Un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS 6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes

2 Un polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica de la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo

3 Un vector que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2

4 Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 3

5 Un método para la producción de un polipéptido, que comprende

a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido, y

b) recuperar el polipéptido del cultivo de la célula huésped

6 Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico

7 Una composición para terapia génica que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2 en combinación con un vector para terapia génica terapéuticamente efectivo

8 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 25

9 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 26

10 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 27

11 Un anticuerpo purificado que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1

12 Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que sea agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del glucagon para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico en un mamífero

13 El uso de la reivindicación 12, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por las SEC ID NOS 6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes

14 El uso de la reivindicación 13, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por la SEC ID NO 25, SEC ID NO 26 y SEC ID NO 27

15 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es la diabetes tipo 2

16 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicha cantidad terapéuticamente efectiva oscila entre aproximadamente 0,1 pg/kg y aproximadamente 1 mg/kg

17 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es el estado pre-diabético de intolerancia a la glucosa

**PEPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y COMO
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGON Y SUS MÉTODOS DE USO
FARMACOLÓGICO**

RESUMEN

La invención provee polipéptidos que actúan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagon. Dichos polipéptidos son útiles para el tratamiento de individuos con diabetes tipo 2 u otros trastornos metabólicos.

221

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : B00176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 05 - 69,873
FECHA SEPTIEMBRE 12 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicacion 42889683 00000005 Folios 78
Fecha (HH): 2005-09-23 17:29:30
Remite : 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 329 COMPLEMEN
Jocendencia 2005 DIVISION DE NUEVOS COMERCIOS

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	31556010	12/09/2005	40,239,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEAS COMERCIALES	91,000 00
		TOTAL :	\$ 91,000 00

SDN NOVENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

Cob 00002-000-038-8