

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Radicación: 04033093 00000003 Folios: 71
Fecha (RECEPCION): 2004-08-04 17:00:26
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 444 NUESTRA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite: 011
Evento: 379
Actuación: 444

Referencia : Expediente No. **04.033.093**
Asunto : Solicitud de patente para **"PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COM AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y COM ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS DE USO FARMACOLÓGICO"**
Solicitante : **BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION**
Fecha de Solicitud : 7 de Abril de 2004

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al oficio número 5539, notificado por fijación en lista el 11 de Junio de 2004.

2. Mediante el oficio número 5539 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atendiendo a las observaciones de la manera siguiente:

De acuerdo con la solicitud hecha por su Despacho, presento nueva copia nítida de la traducción al español de la solicitud de patente **"PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COM AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS DE USO FARMACOLÓGICO"**.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, - 4 AGO. 2004
Señora Jefe,


EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

SOLO 14125-841-005-1
PRP/PRP/ID-000031/WPC14125

**PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS
DE USO FARMACOLÓGICO**

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 glucagón 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 glucagón-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[®], VOGLIBOSE[™] y MIGLITOL[®]), insulino-sensibilizantes (por ej., Avandia[™], Actos[™] y Rezulin[™]), secretagogos de insulina (sulfonilureas "SFUs") y otros agentes que actúan a través del canal de K⁺ ATP-dependiente), y GLUCOPHAGE[™] (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 Avandia[™] (rosiglitazona) y Actos[™], 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 Avandia[™] y Actos[™]. Aún 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 Avandia[™] y Actos[™] se asocian a retención de líquidos, edema y aumento de peso. Avandia[™] no está indicada para usar con la insulina debido a la preocupación por la insuficiencia cardíaca congestiva. Rezulin[™] (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 Pepaglinida son drogas de corta acción que deben tomarse tres veces por día. Se utilizan sólo 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 glucogenolisis y la gluconeogenesis.

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 glucagón que actúan como antagonistas del glucagón y reducen la hiperglucemia en ratas diabéticas. Sin embargo, ningún antagonista peptídico del glucagón ha avanzado más allá del desarrollo preclínico. Una cantidad de antagonistas no peptídicos del receptor del glucagón de estructuras diversas se han informado en la literatura científica y de patentes. Sin embargo, los intentos por identificar inhibidores del receptor del glucagón molecularmente pequeños han encontrado limitado éxito *in vivo*. El único antagonista de la acción del glucagón que se sabe activo en un estudio

clínico es un compuesto identificado como BAY 27-9955. Un efecto colateral potencial del antagonismo frente al glucagón 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 glucagón 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 glucagón *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención provee polipéptidos novedosos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón 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 glucagón. 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 glucagón 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 DESCRIPCIÓN 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.

DESCRIPCIÓN 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 glucagón. Los polipéptidos de la invención funcionan in vivo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón 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 glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista de la estructura: la familia

glucagón/secretina. La alineación acumulada siguiente muestra as relaciones estructurales primarias.

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEC ID NO:1)
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (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, pág. 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 glucagón incrementa las concentraciones plasmáticas de glucosa.

Dado el papel de los GLP-1s 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 glucagón deberían demostrar también ser valiosos en el tratamiento de las enfermedades, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenolisis y la gluconeogenesis. Sin embargo, estos hechos por sí 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 glucagón. 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 glucagón.

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

Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. 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 β 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 glucagón en uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* de inhibición de la activación del receptor del glucagón. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos *in vitro* de inhibición del aumento del cAMP celular mediado por glucagón, ensayos *in vitro* para medir la inhibición de la liberación de glucosa mediada por glucagón de, por ejemplo, hepatocitos cultivados, o ensayos *in vivo* de producción de glucosa estimulada por glucagón, 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:6:32 y (2) sus fragmentos, derivados, variantes y análogos que funcionen como antagonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón 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 fragmentarios, 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 ó 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 (PGE) 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 posttraduccional, 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, ribosilación 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

piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un ancla de GPI, hidroxilación, iodación, metilación, miristoilación, 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. Edición, 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); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol* 182:626-46 (1990); Ratan *et al.*, *Ann. 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 ó 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 ó 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 ó 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 C_{12} y C_{20} , con preferencia un ácido graso de entre C_{14} y C_{18} y, por sobre todo, con mayor preferencia, de C_{16} . ejemplos de dichos polipéptidos son las SEC ID NOS:28-32, que contienen un resto de ácido graso de C_{16} (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 ó 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 ó 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 ó 10 posiciones) pueden ensayarse para detectar la actividad agonista del receptor del GLP-1 y la actividad antagonista del receptor del glucagón utilizando métodos bien conocidos en el arte y que se describen en los ejemplos específicos más 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 glucagón.

Cualquier secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención se puede utilizar para expresar el polipéptido. Los polinucleótidos

pueden consistir sólo 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 procariota o eucariota 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 preferido de esta realización, un vector de expresión comprende además secuencias regulatorias, 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*, λ P_R , P_L 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 variegata. 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 el 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 e la presente invención. Se describen vectores de clonación y expresión adecuados para utilizar con huéspedes procaríotas y eucariotas, según se mencionó anteriormente y en Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2da. Edición (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 polioma 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 período 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, más 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 sólo 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, al 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; Cristal, "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 ó 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 β -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.

Retrovirus

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, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, según se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14, 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 CaPO_4 . 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 sitio-específica en el cromosoma humano 19 (Ali *et al.*, 1994, en la página 377).

Terapia transcariótica

Una aproximación diferente a la terapia génica es la "terapia transcariótica", 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 transcariótica supone que el individuo tiene un complemento normal de genes necesario para la activación. La terapia transcariótica implica introducir un promotor u otra secuencia regulatoria exógena capaz de activar los genes incipientes 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 sólo 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 Síntesis 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/Triisopropil 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 eselectrometría de masa MALDI en un Espectrómetro de Masa VOYAGER DE™ 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 separando el 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 *Bam*HI o *Eco*RI 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 *Bam*HI y *Eco*RI y se liga al pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech), que también se ha obtenido por ruptura con *Bam*HI y *Eco*RI.

Por ejemplo, cuando la secuencia de ADN del polipéptido identificado como SEC ID NO:7 se clonó en el pGEX-6P-1, se expresó la siguiente secuencia de polipéptido en forma de fusiones con glutatión 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 (*Bam*HI y *Eco*RI) 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 DO_{600} 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 pélite 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 homogeneizó. 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 Glutathión 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 ($CaCl_2$ 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-SDS 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

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLDSPRAQDFVQWLMNT (SEC ID NO:1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSPRAQDFVQWLKGR-NH ₂ (SEC ID NO:4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:7)
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:8)
G56	HSQGTFTSDYAAAYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLDAAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (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	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO:22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEC ID NO:23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEC ID NO:24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO:25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (22kD) (SEC ID NO:26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (43kD) (SEC ID NO:27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEC ID NO:29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVRGRG (SEC ID NO:30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGK(FA) (SEC ID NO:31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVGRG (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 pélet 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 pélet 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 (Tris 20mM, 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 politrón. Todos los buffers y agitadores se conservaron a 4°C . La suspensión se homogeneizó 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 pélets 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 pélet 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 $200.000 \times g$ durante 15 minutos. El pélet 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 O_2 /5% de CO_2 *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 Liberasa 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 ó 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 ó 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 menos de 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 diluídas en buffer de unión junto con GLP-1 marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-6} 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 glucagón 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 glucagón 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 ó 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 glucagón 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 glucagón 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 glucagón 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 ó 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 ó 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 ó 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 0,5% y aproximadamente 1000% (es decir, 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 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. " 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 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 Prism 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 s 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 glucagón 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 glucagón 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, ó 75%) de la máxima actividad inducida por el glucagón 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 ó 5%). Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagón 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 ó 40%) de la máxima actividad inducida por el glucagón 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 ó 1%). La "potencia relativa" es la EC_{50} del

después de 10 min de incubación y las células se lisaron en el reactivo de

glucagón 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 glucagón 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 $7,5 \times 10^4$ ó 2×10^5 células/pocillo en Hepes-bicarbonato que contenía 1% de BSA e IBMX $100 \mu M$. luego del equilibrado a $37^\circ C$ 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 glucagón y la concentración del polipéptido para una respuesta del 50% (EC_{50}) x 100, determinado a partir de un mínimo de tres ensayos) para la activación del receptor del glucagón para los polipéptidos de la invención fue <5%. La máxima actividad inducida osciló entre el 28,3% y el 71,3% del péptido nativo glucagón (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos).

La capacidad del péptido híbrido para inhibir la actividad del glucagón se midió de la siguiente manera: luego del equilibrado a $37^\circ C$ en un medio de 5% de

CO₂/95% de O₂ durante 10 minutos, se agregó péptido 10 μ M a las células, seguido inmediatamente de una concentración submáxima de glucagón 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 glucagón submáximo solo menos la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo y péptido 10 μ M, dividido por la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo solo, y multiplicado por 100. La inhibición porcentual promedio de la actividad del glucagón 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 glucagón, 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 ó 100%).

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagón 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 μ l/pocillo) y se pre-incubaron en una incubadora a 37°C con agitación constante y bajo un flujo de 95% de O₂/5% de CO₂ durante 10 minutos. Los hepatocitos se incubaron durante otros 30 minutos después del agregado de glucagón 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 1M (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 Analysis, H.U. Bermeyer, Ed., Academic Press) y se leyó la A_{340} en un lector de placas fMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La liberación de glucosa se calculó después de reatar 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 glucagón 1nM solo menos la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1 nM y péptido 100 nM, dividido por la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1nM 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 glucagón 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, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, ó 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 ó 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 incrementó 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 ó 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 pelletizaron. Las células se cultivaron durante toda la noche en un medio. El medio se aspiró y las células se pre-incubaron con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía glucosa 3mM durante 30 minutos a 37°C. El buffer de pre-incubación 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 glucagón en ratas Wistar alimentadas

La inhibición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en este ensayo es una inhibición de por lo menos el 20%. El componente antagonista del receptor del glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón 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 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón 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 glucagón, 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención o glucagón + 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 glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón en presencia de 1 nmol/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100.

El glucagón solo elevó los niveles de glucosa sanguínea mientras que los polipéptidos de la invención solos 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 glucagón en un 63%. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 16

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C 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 glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón en ratones, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100% (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón 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 derivatizado por inyección subcutánea 17 horas antes de la provocación con glucagón. Al día siguiente los ratones se sometieron a ayuno durante 2 horas antes de recibir una

inyección endovenosa de 10 µg/kg de glucagón 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 glucagón 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 glucagón. La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 10 µg/kg de glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por µg/kg de glucagón en presencia de 100 µg/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 100 µg/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100. Ver la Tabla 3.

Tabla 3

Grupo	Glucosa (mg/dl)				% de 10 µg/kg de Glucagón	% de Inhibición
	0 min.	15 min.	Delta (15-0)	-Vehículo delta		
Vehículo	92	108	16			
10 µg/kg de glucagón	95	195	100	84	100	
10 µg/kg de glucagón + 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 invención 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 aún, 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 ó 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%) ó 1 nmol/kg de GLP-1 (control positivo) ó 1 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 3-4, 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 aún, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 100% (es decir, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 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 µg/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 metoxi-PEG-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 mPEG-mal. (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 6 (fosfato de Na 0,1 M/ NaCl 0,1 M/EDTA 0,1 M). Después de 0,5 hora 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 SDS-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 (Harris, *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 glucagón

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 $\mu\text{g/kg}$ 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 glucagón se determinó como se describe en el Ejemplo 11. Se suministró a ratas o ratones 100 $\mu\text{g/kg}$ 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 glucagón *in vivo*.

Péptido	GLP-1				Glucagón		
	IC_{50} de RIN (nM)	Potencia Relativa (%)	% GLP-1 máx.	Disminución de ABC en IPGTT in vivo (%) ^a	IC_{50} 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	32,8	
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	112,9		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	98,3	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 µg/kg de péptido

b = provocación con glucagón en ratones 17 horas posteriores a la dosificación con 100 µg/kg de péptido

ND = no determinado

LISTADO DE SECUENCIAS**<110> Pan, Clark****<120> Péptidos que actúan 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

<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> LÍFIDO
 <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

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo.

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 glucagón 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 µg/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.

p.: BAYER CORPORATION

**PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN 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 glucagón. Dichos polipéptidos son útiles para el tratamiento de individuos con diabetes tipo 2 u otros trastornos metabólicos.

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO.
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación N°	04-33093
	Solicitud internacional	PCT/US02/31693
	Fecha límite fase nacional	05/05/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	735
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la Decisión 486.

Cúmplase
Dado en Bogotá D C, **29 AGO. 2005**


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones

202051