

No. 13-301132-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:45:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 174

# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

### SOLICITUD

### PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54.TITULO: AGONISTAS DEL RECEPTOR DE  
GLUCAGÓN/GLP-1 DE ACCIÓN PROLONGADA

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL

71. SOLICITANTE: PROLOR BIOTECH INC.

DOMICILIO: NES ZIONA, ISRAEL.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

|                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>Industria y Comercio<br/>SUPERINTENDENCIA</div> | <div>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</div> <div><br/>No. 13-301132- -00000-0000</div> <div>Fecha: 2013-12-27 13:45:32    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR<br/>Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI<br/>Act. 411 PRESENTACION    Folios: 174</div> |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                                                                                | TIPO DE SOLICITUD                                                                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2                                                                                                                                                                                | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                                                                        |                                                                                                            |                                                                                                |
| Solicitud Internacional No.                                                                                                                                                      |                                                                                                                                               | PCT/US2012/040744                                                                                          | Fecha 04 de junio de 2012                                                                      |
| Publicación Internacional No.                                                                                                                                                    |                                                                                                                                               | WO 2012/167251 A1                                                                                          | Fecha 06 de diciembre de 2012                                                                  |
| 3                                                                                                                                                                                | TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)                                                                                    |                                                                                                            |                                                                                                |
| AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1 DE ACCIÓN<br>PROLONGADA                                                                                                                 |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 4                                                                                                                                                                                | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 38/26                                                                                                  |                                                                                                            |                                                                                                |
| 5                                                                                                                                                                                | SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL<br>PROLOR BIOTECH INC.                                                                                                                                  |                                                                                                                                               | NOMBRE                                                                                                     | IDENTIFICACIÓN<br>TIPO                                                                         |
| 6                                                                                                                                                                                | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                                                                         |                                                                                                            |                                                                                                |
| DIRECCIÓN: 7 Golda Meyer Streer, Weizmann Science Park No. TELÉFONO:<br>CIUDAD: Nes Ziona 74140, CORREO ELECTRONICO:<br>PAÍS DE RESIDENCIA: ISRAEL LUGAR DE CONSTITUCIÓN: ISRAEL |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 7                                                                                                                                                                                | INVENTOR (ES)                                                                                                                                 |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS<br>1.FIMA,<br>2.HERSHKOVITZ,                                                                                                                                           |                                                                                                                                               | NOMBRES<br>Udi Eyal<br>Oren                                                                                | NACIONALIDAD<br>Israeli<br>Israeli                                                             |
| DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 8                                                                                                                                                                                | DATOS INVENTOR (ES)                                                                                                                           |                                                                                                            |                                                                                                |
| DIRECCIÓN<br>1. 30 Albek St. 84833<br>2. 10/17 Rupin Street, 75256                                                                                                               |                                                                                                                                               | CIUDAD<br>Beer Sheva<br>Rishon Lezion                                                                      | ESTADO<br>PAÍS RESIDENCIA<br>ISRAEL<br>ISRAEL                                                  |
| OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)                                                                                                                                |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.                                                                    |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 9                                                                                                                                                                                | <input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO                                                    |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS<br>LÓPEZ DÍAZ                                                                                                                                                          |                                                                                                                                               | NOMBRES<br>SILVANA MARIA                                                                                   | IDENTIFICACIÓN<br>C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ                                              |
| DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6                                                                                                                                            |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO 6181088.                                                                                      |                                                                                                |
| CIUDAD Bogotá, D.C.                                                                                                                                                              |                                                                                                                                               | CORREO ELECTRÓNICO                                                                                         | notificaciones@clarkemodet.com.co.                                                             |
| PAÍS Colombia                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 10                                                                                                                                                                               | DECLARACIONES DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                            |                                                                                                            |                                                                                                |
| (33) PAÍS DE ORIGEN                                                                                                                                                              |                                                                                                                                               | CÓDIGO PAÍS                                                                                                | (31) NÚMERO                                                                                    |
| 1.Estados Unidos                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               | US                                                                                                         | 61/492,448                                                                                     |
| 2.Estados Unidos                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               | US                                                                                                         | 61/624,589                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               |                                                                                                            | (32) FECHA AAA/MM/DD                                                                           |
|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               |                                                                                                            | 2011/06/02                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               |                                                                                                            | 2012/04/16                                                                                     |

2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS                                      |                                                                                                                                                            |                  |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.                                                                                                                                                                       |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                      |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| 12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES                                          |                                                                                                                                                            |                  |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.                                                                                                                                                                    |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| 13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | REDUCCIÓN DE TASAS                                                                            |                                                                                                                                                            |                  |
| Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.                                                                                                                                          |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Micro, pequeñas y medianas empresas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Universidades públicas o privadas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Entidades sin ánimo de lucro <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| 14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO |                                                                                                                                                            |                  |
| Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet. |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO                                                        | Nº 13-129173//<br>13-                                                                                                                                      | Fecha 13/12/2013 |
| 16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | FIRMA DEL APODERADO :                                                                         |                                                                                                                                                            |                  |
| <div>SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ<br/>C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                               |                                                                                                                                                            |                  |
| 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ANEXOS                                                                                        |                                                                                                                                                            |                  |
| Documentación Técnica<br>Solicitud Internacional en castellano                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                               | Documentación Jurídica                                                                                                                                     |                  |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Descripción      Nº de folios: 152                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                               | 9. <input type="checkbox"/> Poderes, si fuera el caso.                                                                                                     |                  |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones      Nº Reivindicaciones: 39                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                               | 10. <input type="checkbox"/> Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. Regla 4.17                             |                  |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o figuras      Nº folios:                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                               | 11. <input type="checkbox"/> Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. |                  |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> Resumen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 12. <input type="checkbox"/> Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.       |                  |
| 5. <input type="checkbox"/> Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                               | 13. Reducción de tasas                                                                                                                                     |                  |
| 6. <input type="checkbox"/> Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                               | Micro, pequeñas o medianas empresas                                                                                                                        |                  |
| 7. <input type="checkbox"/> Arte final 12 x 12.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.                |                  |
| 8. <input type="checkbox"/> Anexo formato digital.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.                                                 |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | Universidades públicas o privadas                                                                                                                          |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación                                                 |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | Entidades sin ánimo de lucro                                                                                                                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Copia de registro vigente en Cámara de comercio.                                                                                  |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Hoja de información complementaria.                                                                                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | <input type="checkbox"/> Otros, especificar                                                                                                                |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 14. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.                                                    |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 15. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.                                                                          |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 16. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.                                       |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                               | 17. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.                                                             |                  |

## AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1 DE ACCIÓN

### PROLONGADA

#### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense número de serie 61/492,448, presentada el 2 de junio de 2011, y la solicitud provisional estadounidense número de serie 61/624,589, presentada el 16 de abril de 2012. Estas solicitudes se incorporan por la presente en su totalidad mediante esta referencia a la presente.

#### CAMPO DE LA INVENCION

15

Se describen oxintomodulina pegilada y pegilada inversa incluyendo composiciones farmacéuticas que comprenden la misma y métodos de uso de esta.

20

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las proteínas y, particularmente, los péptidos cortos son susceptibles de desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. Por consiguiente, las proteínas en general tienen semividas en circulación cortas de varias horas. Dada su baja estabilidad, los fármacos de

péptido generalmente se administran con una frecuencia sostenida de modo de mantener una concentración eficaz en plasma del péptido activo. Además, dado que los fármacos de péptido generalmente se administran mediante infusión, 5 inyección frecuente de los fármacos de péptido provocan un malestar considerable a un sujeto. Por lo tanto, se requieren tecnologías que prolongarán las semividas de las proteínas y péptidos terapéuticos a la vez que se mantiene una alta eficacia farmacológica de estas. Dichos fármacos 10 de péptido deseados también deberían cumplir con los requisitos de mayor estabilidad en suero, alta actividad y baja probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria no deseada cuando se inyectan a un sujeto.

15 La farmacocinética desfavorable, como una semivida corta en suero, puede prevenir el desarrollo farmacéutico de muchos fármacos posibles por lo demás prometedores. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula, y se debe determinar experimentalmente para cada posible fármaco 20 nuevo. Por ejemplo, con fármacos de proteína de menor peso molecular, los mecanismos de depuración fisiológica, tal como la filtración renal puede volver inviable el mantenimiento de los niveles terapéuticos de un fármaco dado el costo o la frecuencia del régimen de dosificación 25 requerido.

El tracto gastrointestinal es responsable de sintetizar y liberar muchas hormonas de péptido que regulan los comportamientos alimenticios, incluyendo la proteína pancreática (PP), péptido similar al glucagón 1 (GLP-1),  
5 péptido YY (PYY) y oxintomodulina (OXM). La OXM surge de un procesamiento postransicional específico del tejido de proglucagón en el intestino y el SNC. Contiene 37 aminoácidos, incluyendo la secuencia completa del glucagón con una extensión de octapéptido básica del extremo C que  
10 demostró contribuir a las propiedades de la OXM tanto in vitro como in vivo pero que no fue por sí solo suficiente a los efectos del péptido. En respuesta a la ingestión de alimento, la OXM se secreta mediante células L intestinales en el torrente sanguíneo proporcionalmente al contenido  
15 calórico del alimento.

La OXM mejora la depuración de glucosa mediante la estimulación de la secreción de insulina luego de la administración oral e intraperitoneal. También regula el  
20 control de la ingesta de alimento. La inyección intracerebroventricular (ICV) e intranuclear de OXM en los núcleos paraventriculares y arqueados (ARC) del hipotálamo inhibe la realimentación en ratas en ayuno (Dakin et ál. 2001; Dakin et ál. 2004). También se ha demostrado esta  
25 inhibición en ratas alimentadas libremente al comienzo de la fase de oscuridad. Además, la administración periférica

de OXM inhibió de forma dependiente de la dosis tanto la ingesta de alimento inducida por ayuno y de fase de oscuridad (Dakin et ál.2004).

5 Anteriormente, se describió un nuevo enfoque conceptual denominado pegilación inversa (publicación de PCT N° WO 98/05361; Gershonov et ál., 2000), para prolongar la semivida de las proteínas y péptidos. De acuerdo con esta tecnología, se preparan profármacos derivando el fármaco  
10 con grupos funcionales que son sensibles a bases y que se pueden retirar en condiciones básicas leves, tales como condiciones fisiológicas. La derivación incluye una sustitución de al menos un amino, grupos hidroxilo mercapto y/o carboxilo de la molécula de fármaco con un enlazador,  
15 tal como 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) y 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS), al que se une un grupo del resto polietilenglicol (PEG). La relación entre el resto PEG y el fármaco no es directa sino que ambos residuos están unidos a distintas posiciones del andamiaje FMS o  
20 estructuras de Fmoc que son muy sensibles a las condiciones básicas. La presente invención se refiere a un derivado de OXM en el que la semivida del péptido se prolonga utilizando la tecnología de pegilación inversa.

25

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición que consiste en un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble ligado o unido al polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante  
5 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para reducir la ingesta de alimento,  
10 reducir el peso corporal o ambos en un sujeto, que comprende el paso de administrarle al sujeto un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible, donde dicho enlazador flexible es  
15 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS). En otra modalidad, el enlazador es un enlazador escindible.

En otra modalidad, la presente invención también  
20 proporciona un método para inducir la tolerancia a la glucosa, mejorar el control glicémico, o ambos en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición que consiste en un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble unido a  
25 un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-

fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la presente invención además proporciona  
5 un método para reducir la resistencia a la insulina en un sujeto, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG).

10

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para extender la semivida biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1, que consiste en el paso de conjugar el agonista a un polímero de  
15 polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible que comprende 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS).

En otra modalidad, la presente invención también  
20 proporciona un método para extender la semivida biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble, que consiste en el paso de conjugar el agonista con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible que comprende 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o  
25 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS).

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1, que consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino del  
5 agonista mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

En otra modalidad, la presente invención también  
10 proporciona un método para reducir una frecuencia de dosis de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble, que consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de dicha oxintomodulina mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo  
15 (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la sensibilidad de insulina en un sujeto, que comprende el paso de administrarle al sujeto  
20 una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG). En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la sensibilidad de insulina en un sujeto, luego  
25 del tratamiento agudo o tratamiento crónico, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de

una composición que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG).

5 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, ejemplos y figuras que siguen a continuación. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y ejemplos específicos, a pesar de que indican modalidades  
10 preferidas de la invención, se brindan a modo de ilustración únicamente, debido a que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

15

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético de OXM, PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM en  
20 ratas macho. Las ratas recibieron una única inyección en bolo SC de OXM natural (62 nmol/kg), PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM (que contiene 278 µg/kg de péptido de OXM) o PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM (que contiene 62 nmol/kg de péptido de OXM) en 0,5 ml de amortiguador de PBS. Las muestras de suero se recogieron de  
25 la vena yugular en los momentos especificados y se analizó

la concentración de OXM usando un kit Elisa de OXM (Bachem, Suiza).

La **Figura 2** son gráficas que muestran el perfil farmacocinético de OXM y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM en ratas macho. Las ratas recibieron una única inyección IV en bolo (A) o SC (B) de OXM natural (62 nmol/kg) o PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (que contiene 62 nmol/kg de peso corporal de péptido de OXM) en 0,5 ml de amortiguador de PBS. Las muestras de suero se recogieron de la vena yugular en los momentos especificados y se analizó la concentración de OXM usando un kit Elisa de OXM (Bachem, Suiza). La inserción superpuesta resalta el perfil de OXM que es evidente en las dos primeras horas luego de la administración.

15

La **Figura 3** es una gráfica que muestra la actividad in vitro de OXM natural, PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM. Las células CHO-K1 que sobreexpresan el receptor GLP-1 (Millipore HTS163C2) se cosecharon en 96 pocillos con la mitad de la superficie blanca a una densidad de 200.000 células/ml y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células se incubaron con concentraciones en aumento de OXM (ALMAC), PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM con o sin suero de rata al 1 % (Bio réclamation). Las concentraciones de cAMP de las células se cuantificaron mediante ensayo HTRF

(Cisbio 62AM4PEB) y el parámetro de EC50 se analizó mediante software PRISM.

La **Figura 4** son gráficas que muestran la inducción de tolerancia a la glucosa en ratones con OXM natural y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM, según las mediciones de la prueba de tolerancia a la glucosa IP (IPGTT). Se mantuvieron en ayunas ratones C57BL/6 durante la noche y luego se les inyectó IP PBS (vehículo), PEG<sub>40</sub>-Osu como control (546 nmol/kg), OXM natural (333 nmol/kg), PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido) y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM (333 nmol/kg). Se administró glucosa (1,5 gr/kg) IP a los 15 min luego de la administración del artículo de prueba (vehículo, OXM y PEG<sub>40</sub>-Osu) o 120 min luego de la administración de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM. Los niveles de glucosa en sangre se midieron mediante muestreo de la vena de la cola antes de la administración de glucosa y 10, 20, 30, 60 y 120 min luego de la administración de glucosa usando un glucómetro portátil. La gráfica (A) proporciona el perfil de glucosa en sangre y la gráfica (B) muestra la AUC de glucosa.

La **Figura 5** son gráficas que muestran el efecto de la administración SC de OXM (b.i.d.) y PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM (días 1, 3, 5, 7) en el peso corporal (A) e ingesta de alimento cumulativa (B) en ratones C57BL/6J machos que presentan

obesidad inducida por la dieta. Los datos son medios ajustados ( $n = 10$ ). SEM se calculan a partir de los residuos del modelo estadístico. Los ratones se dosifican durante 7 días comenzando el Día 1. Los datos analizados por ANCOVA con peso corporal el Día 1 como covariable seguido de prueba de Williams (OXM en PBS) o prueba t múltiple (sibutramina y PEG40-FMS-OXM) versus el vehículo apropiado. Diferencias significativas versus vehículo apropiado:  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . Los valores porcentuales indican la diferencia con el grupo de vehículo apropiado el Día 8 (es decir, luego de 7 días de dosificación).

La **Figura 6** es una gráfica que muestra el efecto de la administración SC de OXM (b.i.d) y OXM PEG40-EMCS-OXM pegilado unido covalentemente (1000 nmol/kg y 5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7 u 8000 nmol/kg los Días 1 y 7), PEG40-FMS-OXM (1000 nmol/kg y 5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7 u 8000 nmol/kg los Días 1 y 7) y PEG30-FMS-OXM (5000 nmol/kg los Días 1, 4 y 7) en el peso corporal (A) e ingesta de alimento (B) en ratones C57BL/6J machos que presentan obesidad inducida por la dieta. Los datos son los promedios ajustados ( $n = 10$ ). SEM se calculan a partir de los residuos del modelo estadístico. Los ratones se dosifican durante 7 días comenzando el Día 1.

La **Figura 7** muestra los efectos de la administración de OXM pegilada inversa en el peso corporal en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO). Durante la primera semana de un único alojamiento (período de manejo), los animales comenzaron un protocolo de manejo de una vez al día y durante la segunda semana (período de referencia), recibieron una dosificación del vehículo apropiado b.i.d. o una vez a la semana a medida que recibieron la dosificación durante el período de tratamiento) mediante una vía subcutánea. 7 grupos (n = 8) de ratones DIO recibieron una dosificación durante 29 días, de la siguiente manera: A. PEG40-SH (662 mg/kg), B. PEG40-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), C. PEG30-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), D. PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), E. PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), F. vehículo (PBS) y G. OXM (6.000 nmol/kg; PBS). Durante el período de referencia y de tratamiento, se registraron a diario la ingesta de alimentos, el consumo de agua y el peso corporal. La administración semanal de PEG40-FMS-OXM o PEG30-FMS-OXM redujo significativamente el peso corporal en los ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO).

La **Figura 8** muestra los efectos agudos de la administración de OXM pegilada inversa en la tolerancia a la glucosa en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO). El Día 1, luego del comienzo de la administración de fármaco o vehículo, todos los ratones se sometieron a ayuno durante

la noche. El Día 2, los ratones se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Cada animal recibió una dosificación del vehículo o compuesto de prueba y 60 minutos después recibieron una dosificación de D-glucosa (2 g/kg po). Se tomaron muestras de sangre de referencia inmediatamente antes de la dosificación del vehículo o compuesto de prueba (B1) e inmediatamente antes de la carga de glucosa (B2). Se tomaron otras muestras de sangre 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos luego de la administración de glucosa. Todas las muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y analizaron para determinar la glucosa (n = 2) e insulina (n = 1) usando el reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y Alpco mouse ultrasensitive insulin ELISA (80-INSMSU-E10), respectivamente.

La **Figura 9** muestra los efectos de la administración de OXM pegilada inversa en glucosa, glicerol, colesterol e insulina terminal en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO). Se recogieron las muestras de plasma terminal (24 horas luego de la dosis final del compuesto de prueba o de control el Día 29) mediante punción cardíaca y se analizaron para determinar la insulina, glucosa y colesterol usando el mouse ultrasensitive insulin ELISA (80-INSMSU-E10), reactivo de glucosa Thermoelectron

Infinity (TR15421) y reactivo de colesterol Thermoelectron  
Infinity (TR13421).

La **Figura 10** muestra los efectos de la administración de  
5 OXM PEGilada inversa en el análisis de la composición  
corporal terminal de grasa, agua, proteína y ceniza (hueso)  
en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO). Se  
determinaron los niveles de grasa corporal (A), agua (B),  
proteína (C) y ceniza (D) de cadáveres de ratón DIO usando  
10 las técnicas de análisis químicos estándar. Los grupos de  
tratamiento fueron los siguientes: A. PEG40-SH (662 mg/kg),  
B. PEG40-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg), C. PEG30-EMCS-OXM (6.000  
nmol/kg), D. PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg), E. PEG30-FMS-  
OXM (6.000 nmol/kg), F. vehículo (PBS) y G. OXM (6.000  
15 nmol/kg; PBS).

La **Figura 11** muestra que la administración de variantes de  
PEG-OXM PEG40-EMCS-OXM, PEG30-EMCS-OXM, PEG40-FMS-OXM,  
PEG30-FMS-OXM produjo reducciones marcadas y significativas  
20 de la insulina de glucosa en ayuno y plasma en ayuno cuando  
se comparan con los controles.

La **Figura 12** muestra que la administración de variantes de  
PEG-OXM PEG30-FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG60-FMS-OXM  
25 produjo reducciones marcadas y significativas de la

insulina de glucosa en ayuno y plasma en ayuno cuando se comparan con los controles.

La **Figura 13** muestra que la administración de variantes de  
5 PEG-OXM PEG5-FMS-OXM, PEG30-FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y  
PEG60-FMS-OXM produjo reducciones marcadas y significativas  
del peso corporal cuando se comparan con los controles.

10

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención proporciona un  
15 agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción  
prolongada y métodos para producirlo y usarlo. En otra  
modalidad, la presente invención proporciona una  
oxintomodulina de acción prolongada y métodos para  
producirlo y usarlo. En una modalidad, un agonista del  
20 receptor de glucagón/ GLP-1 doble de acción prolongada es  
una composición que comprende o consiste en oxintomodulina,  
polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y  
9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En otra modalidad, una  
25 oxintomodulina de acción prolongada es una composición que  
comprende o consiste en oxintomodulina, polímero de

polietilenglicol (polímero de PEG) y  
9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En otra modalidad, la  
presente invención proporciona un péptido de oxintomodulina  
5 modificad que comprende un péptido de oxintomodulina, un  
polímero de polietilenglicol (PEG) y un  
9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En otra modalidad, la  
presente invención proporciona un péptido de oxintomodulina  
10 modificada que consiste en un péptido de oxintomodulina, un  
polímero de polietilenglicol (PEG) y un  
9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En una modalidad, una  
oxintomodulina de acción prolongada es una composición que  
15 comprende o consiste en oxintomodulina y polímero de  
polietilenglicol (polímero de PEG).

En una modalidad, los términos "agonista del receptor de  
glucagón/GLP-1" y "agonista" doble se usan de manera  
20 intercambiable en la presente. En otra modalidad, los  
términos también incluyen cualquier agonista del receptor  
de glucagón/GLP-1 conocido en la técnica. En otra  
modalidad, el agonista preferido es oxintomodulina u OXM o  
una variante funcional de esta.

25

En una modalidad, el término "funcional" se refiere a la capacidad del agonista u OXM proporcionada en la presente de tener actividad biológica, que incluye de modo no taxativo, reducir el peso, aumentar la sensibilidad a la insulina, etc., como se proporciona adicionalmente en la presente.

En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada. En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada inversa. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es una oxintomodulina pegilada inversa. En otra modalidad, las frases "oxintomodulina de acción prolongada", "oxintomodulina pegilada inversa", "OXM PEGilada inversa" y "una composición que comprende o consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS)" se usan de manera intercambiable. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es OXM unida a PEG mediante Fmoc o FMS.

En una modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada proporcionado en la presente

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

10

En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
15 fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:0,2-10:0,2-10. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-  
20 sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de 1:0,5-2:0,5-2. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada es una composición que comprende o consiste en oxintomodulina, polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y 9-  
25 fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de

1:1:1. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada incluye un polímero de PEG conjugado con el extremo amino de oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.

- 5 En una modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada se une a PEG mediante un enlazador inverso, tal como, de modo no taxativo, Fmoc y FMS. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada se une a PEG mediante un enlazador inverso, tal
- 10 como, de modo no taxativo, Fmoc y FMS. En otra modalidad, Fmoc y FMS son sensibles a las bases y se retiran en condiciones fisiológicas. En otra modalidad, un enlazador inverso es un enlazador que es sensible a las bases y se retira en condiciones fisiológicas. En otra modalidad, un
- 15 enlazador inverso es un enlazador que es sensible a las bases y se retira en condiciones fisiológicas en la sangre, plasma o ganglio linfático. En otra modalidad, un enlazador inverso es un enlazador que es sensible a las bases y se retira en condiciones fisiológicas en un fluido corporal.
- 20 En otra modalidad, un enlazador inverso es un enlazador que se retira en un fluido corporal con un pH básico. En otra modalidad, un enlazador que es sensible a las bases se escinde luego de la exposición a un ambiente básico que libera así OXM del enlazador y PEG.

25

En otra modalidad, una oxintomodulina pegilada inversa es una composición donde OXM se une a PEG mediante un enlazador inverso. En otra modalidad, una oxintomodulina pegilada inversa libera la OXM libre luego de la exposición a un ambiente básico. En otra modalidad, una oxintomodulina pegilada inversa libera la OXM libre luego de la exposición a la sangre o plasma. En otra modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada comprende PEG y oxintomodulina que no están unidos directamente entre sí, como en los procedimientos de pegilación estándar, sino que ambos residuos se unen a distintas posiciones de Fmoc o FMS que son altamente sensibles a las bases y se pueden retirar en condiciones fisiológicas normales. En otra modalidad, las condiciones fisiológicas normales incluyen un ambiente fisiológico, como la sangre o el plasma.

En una modalidad, una oxintomodulina de acción prolongada se conjuga de forma no inversa con PEG usando EMCS (ver Ejemplo 3).

En otra modalidad, las estructuras y los procesos para realizar Fmoc y FMS se describen en la patente estadounidense N° 7585837. La descripción de la patente estadounidense N° 7585837 se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

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

5

En una modalidad, la pegilación inversa proporciona protección contra la degradación de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble. En otra modalidad, la pegilación inversa proporciona protección contra la degradación de OXM.

10

En otra modalidad, la pegilación inversa afecta la  $C_{\text{máx}}$  de OXM para reducir los efectos secundarios dañinos. En otra modalidad, la pegilación inversa extiende la  $T_{\text{máx}}$  de OXM. En otra modalidad, la pegilación inversa extiende la semivida circulatoria de OXM. En otra modalidad, la OXM pegilada inversa presenta mayor biodisponibilidad en comparación con la OXM no modificada. En otra modalidad, la OXM pegilada inversa presenta mayor actividad biológica en comparación con la OXM no modificada. En algunas modalidades, la pegilación inversa aumenta la potencia de OXM.

15

20

En otras modalidades, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de medidas bioquímicas. En otras modalidades, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de medidas farmacológicas. En otras modalidades, una OXM

25

pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de capacidad de unión ( $K_d$ ). En otras modalidades, una OXM pegilada inversa es al menos equivalente a la OXM no modificada, en términos de absorción a través del sistema digestivo. En otras modalidades, una OXM pegilada inversa es más estable durante la absorción a través del sistema digestivo que la OXM no modificada.

10 En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble presenta mayores niveles de área bajo la curva (AUC) en sangre, en comparación con el agonista libre. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa presenta mayores niveles de área bajo la curva (AUC) en sangre, en  
15 comparación con la OXM libre. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa presenta mayores niveles de actividad biológica y área bajo la curva (AUC) en sangre, en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado  
20 inverso presenta un mayor tiempo de retención en sangre ( $t_{1/2}$ ), en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa presenta un mayor tiempo de retención en sangre ( $t_{1/2}$ ), en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa presenta mayor  
25 actividad biológica y tiempo de retención en sangre ( $t_{1/2}$ ), en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, una OXM

pegilada inversa presenta mayores niveles de  $C_{\text{máx}}$  en sangre en comparación con la OXM libre, reduciendo así los efectos secundarios potencialmente dañinos. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa presenta mayor actividad biológica en  
5 comparación con la OXM libre. En otra modalidad, se proporciona en la presente un método para mejorar AUC,  $C_{\text{máx}}$ ,  $t_{1/2}$ , actividad biológica, o cualquier combinación de estos, de OXM, que comprende o consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el  
10 extremo amino de la OXM libre mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS). Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención también proporciona un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de  
15 oxintomodulina, que consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de dicha oxintomodulina mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

20

En una modalidad, se puede cuantificar la actividad del agonista de glucagón o GLP-1 de cualquier péptido análogo de glucagón determinado determinando un valor de  $EC_{50}$  para dicho péptido en un ensayo seleccionado para la actividad  
25 de glucagón o GLP-1. Como lo sabrá el experto en la técnica, el valor de  $EC_{50}$ , es una medida de la

concentración a la cual se alcanza la mitad de la actividad máxima del compuesto en el ensayo particular. En la presente memoria descriptiva, el valor de  $EC_{50}$  en un ensayo para determinar la actividad del agonista de glucagón o GLP-1 se denominará  $EC_{50}[\text{Glu}]$  y  $EC_{50}[\text{GLP-1}]$ , respectivamente. Cuando se comparan los valores  $EC_{50}$  para distintos compuestos, se entenderá que describen la actividad de los compuestos pertinentes en el mismo ensayo en condiciones por lo demás idénticas.

10

La relación  $EC_{50}[\text{Glu}]/EC_{50}[\text{GLP-1}]$  para el péptido análogo de glucagón será mayor que la relación  $EC_{50}[\text{Glu}]/EC_{50}[\text{GLP-1}]$  para glucagón. Esto se puede interpretar como que el péptido análogo de glucagón presenta una mayor selectividad para el receptor GLP-1 que el glucagón.

En otra modalidad, la mejora de AUC,  $C_{\text{máx}}$ ,  $t_{1/2}$ , actividad biológica, o cualquier combinación de estos, de OXM, conjugando un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de la OXM libre mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) posibilita la reducción de la frecuencia de dosificación de OXM. En otra modalidad, en la presente se proporciona un método para reducir una frecuencia de dosificación de OXM, que comprende o consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol

(polímero de PEG) con el extremo amino o residuos de lisina de OXM mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS). En otra modalidad, la pegilación inversa de OXM es ventajosa para permitir que  
5 se usen menores dosis.

En otra modalidad, OXM comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra modalidad, OXM consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.  
10 En otra modalidad, la SEQ ID N°:1 comprende o consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA (SEQ ID N°:1). En otra modalidad, OXM comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada en CAS N° 62340-29-8.

15

En otra modalidad, OXM es OXM humana o cualquier OXM de mamífero. En otra modalidad, OXM también se denomina enteroglucagón bioactivo o glucagón-37. En otra modalidad, OXM es un agonista del receptor de glucagón/GLP-1. En otra  
20 modalidad, OXM es un fragmento biológicamente activo de OXM.

En otra modalidad, OXM biológicamente activa se extiende desde el aminoácido 30 hasta el aminoácido 37 de la SEQ ID N°:1. En otra modalidad, OXM biológicamente activa se  
25 extiende desde el aminoácido 19 hasta el aminoácido 37 de la SEQ ID N°:1. En otra modalidad, la OXM de la invención

corresponde a un octapéptido del cual los dos aminoácidos de extremo C se eliminan. En otra modalidad, la OXM de la invención corresponde a cualquier fragmento de la SEQ ID N°:1 que mantiene la actividad de OXM, como se describe en la presente.

En una modalidad, OXM se refiere a un homólogo de péptido del péptido de la SEQ ID N°:1. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 40 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 50 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 60 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 70 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto. En una modalidad, la

secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 80 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto.

5

En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 90 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de OXM de la presente invención es al menos 95 % homóloga a la secuencia de OXM establecida en la SEQ ID N°:1, según se determina usando el software BlastP del NCBI usando parámetros por defecto.

15

En comparación con la OXM de tipo salvaje, los derivados de OXM o variantes de la presente invención contienen varias sustituciones de aminoácidos, y/o se pueden PEGilar o modificar de otro modo (por ejemplo, recombinante o químicamente).

20

La OXM proporcionada en la presente también abarca cualquier análogo de la secuencia de OXM que antecede. Cualquier uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia se puede remplazar independientemente con un remplazo conservador, como es conocido en la técnica, es decir,

25

remplazando un aminoácido con uno de un tipo químico similar, tal como remplazando un aminoácido hidrofóbico con otro. De manera alternativa, se pueden realizar mutaciones de aminoácidos no conservadoras que dan como resultado una  
5 actividad biológica o efecto mejorado de OXM. En particular, la OXM se modifica para que sea resistente a la escisión e inactivación mediante dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

10 Los derivados y variantes de OXM y métodos de generarlos se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2011/0152182, publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2011/0034374, publicación de solicitud de patente estadounidense N° 2010/0144617, los  
15 cuales se incorporan mediante esta referencia a la presente.

En una modalidad, el agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble proporcionado en la presente se puede modificar  
20 químicamente. En otra modalidad, la OXM proporcionada en la presente se puede modificar químicamente. En particular, se pueden modificar las cadenas laterales de aminoácidos, el extremo amino y/o el término ácido carboxi de OXM. Por ejemplo, la OXM se puede someter a uno o más de  
25 alquilación, formación de disulfuro, complejación de metales, acilación, esterificación, amidación, nitración,

tratamiento con ácido, tratamiento con base, oxidación o reducción. Los métodos para realizar estos procesos son conocidos en la técnica. En particular, la OXM se proporciona como un éster de alquilo inferior, una amida de alquilo inferior, una amida de dialquilo inferior, una sal de adición de ácidos, una sal de carboxilato o una sal de adición alcalina de estos. En particular, los extremos amino o carboxílicos de la OXM se pueden derivar mediante, por ejemplo, esterificación, amidación, acilación, oxidación o reducción. En particular, el término carboxílico de la OXM se puede derivar para formar un resto amida.

En una modalidad, el agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención mantiene la actividad biológica del agonista no modificado. En otra modalidad, la OXM de la invención mantiene la actividad biológica de la OXM no modificada. En una modalidad, la OXM de acción prolongada de la invención mantiene la actividad biológica de la OXM no modificada. En otra modalidad, la OXM de acción prolongada de la invención comprende la actividad biológica de la OXM. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir las secreciones digestivas. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir y retrasar el

vaciamiento gástrico. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición del patrón de motilidad alimenticio en el intestino delgado. En otra modalidad, la actividad

5 biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la secreción de ácido estimulada por pentagastrina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende un aumento de la liberación de somatostatina

10 gástrica. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende potenciar los efectos del péptido YY. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la liberación de

15 grelina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la regulación por aumento de adiponectina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir los ácidos grasos libres. En

20 otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir los triglicéridos. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir el colesterol.

25 En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la estimulación

de la acumulación de aminopirina y la producción de cAMP. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la unión del receptor de GLP-1 o del receptor de glucagón. En otra  
5 modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende estimular la producción de H<sup>+</sup> activando la adenilato ciclasa. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende la inhibición de la  
10 secreción de ácido gástrico estimulada por histamina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende inhibir la ingesta de alimento. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende  
15 estimular la liberación de insulina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende inhibir la secreción exocrina del páncreas. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende aumentar  
20 la sensibilidad a la insulina. En otra modalidad, la actividad biológica de una OXM de acción prolongada de la invención comprende reducir los niveles de glucosa.

En una modalidad, los términos "reducir el nivel de" se  
25 refiere a una reducción de alrededor de 1-10 % con respecto a un nivel original, de tipo salvaje, normal o de control.

- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 11-20 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 21-30 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 31-40 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 41-50 %.
- 5 En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 51-60 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 61-70 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 71-80 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 81-90 %.
- En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 91-95 %.
- 10 En otra modalidad, la reducción es de alrededor de 96-100 %.

- En una modalidad, los términos "aumentar el nivel de" o "extender" se refiere a un aumento de alrededor de 1-10 %
- 15 con respecto a un nivel original, de tipo salvaje, normal o de control. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 11-20 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 21-30 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 31-40 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 41-50 %.
- 20 En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 51-60 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 61-70 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 71-80 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 81-90 %. En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 91-95 %.
- 25 En otra modalidad, el aumento es de alrededor de 96-100 %.

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para inducir la tolerancia a la glucosa, mejorar el control glicémico o ambos en un sujeto  
5 que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición que consiste en un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble unido a un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante  
9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
10 fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para inducir la tolerancia a la  
15 glucosa, mejorar el control glicémico o ambos en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición que consiste en una oxintomodulina unida a un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante 9-  
20 fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención también proporciona  
25 un método para extender la semivida biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble, que consiste

en el paso de conjugar el agonista con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible que comprende 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

5

En una modalidad, la presente invención también proporciona un método para extender la semivida biológica de oxintomodulina, que consiste en el paso de conjugar oxintomodulina, un polímero de polietilenglicol (polímero  
10 de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de alrededor de 1:1:0,5 a alrededor de 1:1:3,5. En otra modalidad, la relación molar es 1:1:10 de OXM a PEG a enlazador. En otra modalidad, el intervalo es 1:1:5- 1:1:9.  
15 En otra modalidad, el intervalo es 1:1:3,7-1:1:4,9.

En otra modalidad, la presente invención también proporciona un método para reducir la ingesta de alimento, reducir el peso corporal o ambos en un sujeto, que  
20 comprende el paso de administrarle al sujeto un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible, donde dicho enlazador flexible es 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
25 fluorenilmetoxycarbonilo (FMS). En otra modalidad, el sujeto sufre de diabetes. En otra modalidad, el sujeto

tiene sobrepeso. En otra modalidad, el sujeto sufre de obesidad.

En otra modalidad, la presente invención también  
5 proporciona un método para reducir la ingesta de alimento,  
reducir el peso corporal o ambos en un sujeto, que  
comprende el paso de administrarle al sujeto oxintomodulina  
conjugada con un polímero de polietilenglicol (polímero de  
PEG) mediante un enlazador flexible, donde dicho enlazador  
10 flexible es 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxicarbonilo (FMS). En otra modalidad, el  
sujeto sufre de diabetes. En otra modalidad, el sujeto  
tiene sobrepeso. En otra modalidad, el sujeto sufre de  
obesidad.

15

En una modalidad, los compuestos PEG-OXM que se  
proporcionan en la presente inducen la reducción  
significativa del nivel de glucosa sin aumentar el nivel de  
insulina. En otra modalidad, los compuestos PEG-OXM que se  
20 proporcionan en la presente reducen inesperadamente los  
niveles de glucosa junto con la reducción de niveles de  
insulina en ayunas seguido de la administración de una  
única dosis de los compuestos PEG-OXM (véase Ejemplo 7, en  
la presente). Por lo tanto, en otra modalidad, la presente  
25 invención proporciona un método para aumentar la  
sensibilidad a la insulina en un sujeto, que comprende el

paso de administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble conjugado con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG). En otra modalidad, la

5 presente invención inesperadamente muestra un aumento marcado en la sensibilidad de insulina luego del tratamiento agudo en un sujeto con la composición de agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble que se proporciona en la presente (véase Ejemplo 7). En otra

10 modalidad, el agonista se conjuga con dicho polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador. En otra modalidad, el agonista es OXM. En otra modalidad, el enlazador es un enlazador flexible. En otra modalidad, el enlazador es 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-

15 sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS). En otra modalidad, el enlazador es un enlazador no escindible. En otra modalidad, el enlazador es N-(ε-Maleimidocaproiloxu) succinimida éster (EMCS).

20 En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende inhibir la secreción pancreática a través de un mecanismo indirecto neural vagal. En otra

25 modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende reducir el transporte hidromineral a

través del intestino delgado. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende estimular la absorción de glucosa. En otra

5 modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende controlar/estimular la secreción de somatostatina. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción

10 prolongada de la invención comprende la reducción de la ingesta de alimento y el aumento de peso corporal. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende la reducción de la adiposidad. En otra

15 modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende la supresión del apetito. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la

20 invención comprende la inducción de la anorexia. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende reducir el peso corporal en sujetos con sobrepeso y obesos. En otra modalidad, la actividad

25 biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende

inducir cambios en los niveles de las hormonas adiposas leptina y adiponectina. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende  
5 aumentar el gasto de energía además de reducir el consumo de energía en sujetos con sobrepeso y obesos. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención comprende disminuir los triglicéridos en plasma y  
10 aumentar los cuerpos de cetona.

En una modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, luego de un tratamiento agudo comprende  
15 disminuir triglicéridos en plasma y aumentar los cuerpos de cetona. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, luego de un tratamiento agudo comprende aumentar la expresión de los genes  
20 gluconeogénicos Pck1, Pgc1 $\alpha$  y Pdh1. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, luego de un tratamiento agudo comprende disminuir los depósitos de acetil-CoA en el hígado, el producto principal  
25 de la descarboxilación de piruvato y malonil-CoA. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del

receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada, luego de un tratamiento agudo comprende regular por aumento los genes que inducen la oxidación de ácido graso (FAO) en el hígado, incluyendo Fgf21 y Cpt1a. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, seguido del tratamiento agudo comprende regular por disminución genes lipogénicos tales como ChREBP. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, seguido del tratamiento agudo comprende regular por aumento el gen Ldlr.

En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, seguido del tratamiento crónico comprende disminuir los niveles de leptina. En otra modalidad, la actividad biológica de un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble de acción prolongada de la invención, seguido del tratamiento crónico comprende aumentar los niveles de b-hidroxibutirato.

En otra modalidad, un polímero de PEG se une al extremo amino o residuo de lisina de oxintomodulina a través de Fmoc o FMS.

En otra modalidad, los términos "unido" y "enlazado" se usan de manera intercambiable. En otra modalidad, el polímero de PEG está enlazado a la cadena lateral  $\alpha$ -amino de OXM. En otra modalidad, el polímero de PEG está enlazado a la cadena lateral  $\varepsilon$ -amino de OXM. En otra modalidad, el polímero de PEG está enlazado a una o más cadenas laterales  $\varepsilon$ -amino de OXM. En otra modalidad, el polímero de PEG comprende un resto sulfhidrilo.

10 En otra modalidad, PEG es lineal. En otra modalidad, PEG es ramificado. En otra modalidad, PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 200 a 200.000 Da. En otra modalidad, PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 80.000 Da.

15 En otra modalidad, PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 40.000 Da. En otra modalidad, PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.

20 En otra modalidad, una OXM de acción prolongada se prepara usando agentes PEGilantes, es decir cualquier derivado de PEG que es capaz de reaccionar con un grupo funcional tal como, de modo no taxativo,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{--N=C=O}$ ,  $\text{--N=C=S}$ ,  $\text{--SO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{--SO}_2\text{CH=CH}_2$ ,  $\text{--PO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{--(CH}_2\text{)}_x\text{Hal}$ ,  
 25 presente en el anillo de fluoreno del resto Fmoc o FMS. En otra modalidad, el agente de PEGilación se usa generalmente

en su forma mono-metoxilada donde solo hay un grupo hidroxilo en un extremo de la molécula de PEG disponible para conjugación. En otra modalidad, se puede usar una forma bifuncional de PEG donde ambos extremos están  
5 disponibles para conjugación, por ejemplo, se desea obtener un conjugado con dos residuos de péptido o proteína unidos covalentemente a un único resto PEG.

En otra modalidad, los PEG ramificados están representados  
10 como  $R(\text{PEG-OH})_m$  donde R representa un resto de núcleo central tal como pentaeritritol o glicerol y m representa la cantidad de grupos ramificados. La cantidad de grupos ramificados (m) puede variar de tres a cien o más. En otra modalidad, los grupos hidroxilo están sujetos a  
15 modificación química. En otra modalidad, las moléculas de PEG ramificadas se describen en las patentes estadounidenses N° 6,113,906, N° 5,919,455, N° 5,643,575, y N° 5,681,567, las cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

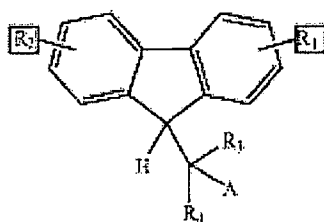
20

En una modalidad, el agonista del receptor de glucagón/GLP-1 es oxintomodulina. En otra modalidad, el agonista del receptor de glucagón/GLP-1 es una variante de oxintomodulina.

25

En otra modalidad, la presente invención proporciona OXM con un resto PEG que no está unido directamente a la OXM, como en el procedimiento estándar de pegilación, pero en vez de esto el resto PEG está unido a través de un  
5 enlazador tal como Fmoc o FMS. En otra modalidad, el enlazador es altamente sensible a bases y se puede retirar en condiciones básicas leves. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS es equivalentemente activa a la OXM libre. En otra modalidad, la OXM conectada  
10 a PEG mediante Fmoc o FMS es más activa que la OXM libre. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS comprende diferentes actividades que la OXM libre. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS a diferencia de la OXM libre, tiene actividad en el sistema  
15 nervioso central. En otra modalidad, la OXM Pegilada inversa cruza la barrera hematoencefálica y actúa en el hipotálamo para ejercer las actividades biológicas que se proporcionan en la presente. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS, a diferencia de la OXM  
20 libre, no puede ingresar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS comprende una semivida en circulación extendida en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, la OXM conectada a PEG mediante Fmoc o FMS  
25 pierde su resto PEG junto con el resto Fmoc o FMS recuperando así la OXM libre.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:  $(X)_n-Y$ , donde Y es un resto de OXM que tiene un amino, carboxilo o hidroxilo libre y X es un  
5 radical de fórmula (i):



10

En otra modalidad,  $R_1$  es un radical que contiene un resto portador de proteína o polímero; resto de polietilenglicol (PEG);  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  
15 hidrógeno, alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, arilo, alcarilo, aralquilo, halógeno, nitro,  $--SO_3H$ ,  $--SO_2NHR$ , amino, amonio, carboxilo,  $PO_3H_2$  y  $OPO_3H_2$ ; R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo,  $R_3$  y  $R_4$ , iguales o diferentes, se seleccionan cada uno del grupo que  
20 consiste en hidrógeno, alquilo y arilo; A es un enlace covalente cuando el radical se une a un grupo amino o hidroxilo del OXM-Y; n es un número entero de al menos uno y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

25 En otra modalidad, los términos "alquilo", "alcoxi", "alcoxialquilo", "arilo", "alcarilo" y "aralquilo" se

utilizan para denotar radicales alquilo de 1-8, preferentemente 1-4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo y radicales arilo de 6-10 átomos de carbono, por ejemplo, fenilo y naftilo. El  
5 término "halógeno" incluye bromo, fluoro, cloro y yodo.

En otra modalidad,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno hidrógeno y A es --OCO--, a saber el radical 9-fluorenilmetoxicarbonilo (en adelante "Fmoc"). En otra modalidad, R es --SO<sub>3</sub>H en la  
10 posición 2 del anillo de fluoreno,  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno hidrógeno y A es --OCO--, a saber el radical 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (en adelante "FMS").

En otra modalidad, la pegilación de OXM y la preparación de  
15 los conjugados de (PEG-Fmoc) $_n$ - OXM o (PEG-FMS) $_n$ - OXM incluye unir MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS al componente de amina de OXM, obteniendo así un conjugado MAL-FMS- OXM o MAL-Fmoc- OXM y luego sustituir PEG-SH por el resto maleimida, produciendo el conjugado (PEG-FMS) $_n$ - OXM o (PEG-  
20 Fmoc) $_n$ - OXM, respectivamente.

En otra modalidad, la pegilación de OXM incluye hacer reaccionar MAL-FMS-NHS o MAL-Fmoc-NHS con PEG-SH, formando así un conjugado PEG-FMS-NHS o PEG-Fmoc-NHS y luego hacerlo  
25 reaccionar con el componente de amina de OXM que da como resultado el conjugado (PEG-FMS) $_n$ - OXM o (PEG-Fmoc) $_n$ - OXM

deseado, respectivamente. En otra modalidad, la pegilación de péptidos/proteínas tales como OXM se describen en la patente estadounidense N° 7585837, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En otra  
5 modalidad, la pegilación inversa de péptidos/proteínas tales como OXM con Fmoc o FMS se describen en la patente estadounidense N° 7585837.

En otra modalidad, las frases "OXM de acción prolongada" y  
10 "OXM pegilada inversa" se usan de manera intercambiable. En otra modalidad, OXM pegilada inversa está compuesta de PEG-FMS-OXM y PEG-Fmoc-OXM que se identifica en la presente por las fórmulas:  $(\text{PEG-FMS})_n\text{-OXM}$  o  $(\text{PEG-Fmoc})_n\text{-OXM}$ , donde n es un número entero de al menos uno, y OXM está unida al  
15 radical FMS o Fmoc a través de al menos un grupo amino.

En otra modalidad, sorprendentemente, la OXM de acción prolongada descrita en la presente es activa en su forma pegilada y en su forma periférica. En otra modalidad,  
20 sorprendentemente, la construcción de  $(\text{PEG-FMS})_n\text{-OXM}$  o  $(\text{PEG-Fmoc})_n\text{-OXM}$  no vuelve a este conjugado inactivo. En otra modalidad, sorprendentemente, la construcción de  $(\text{PEG-FMS})_n\text{-OXM}$  o  $(\text{PEG-Fmoc})_n\text{-OXM}$  no vuelve a la OXM inactiva.

## 25 Usos terapéuticos

En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para la prevención de hiperglucemia, para mejorar el control glicémico, para el tratamiento de diabetes mellitus que se selecciona del grupo que consiste en diabetes mellitus no insulino dependiente (en una modalidad, diabetes Tipo 2), diabetes mellitus insulino dependiente (en una modalidad, diabetes Tipo 1) y diabetes mellitus gestacional o cualquier combinación de estas. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para tratar la diabetes tipo 2. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para aumentar la sensibilidad a la insulina. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para reducir la resistencia a la insulina.

En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para suprimir el apetito. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para inducir la saciedad. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para la reducción del peso corporal. En otra modalidad, PEG-Fmoc-

OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para la reducción de la grasa corporal. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para la reducción del índice de masa corporal. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para la reducción del consumo de alimentos. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para tratar la obesidad. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para tratar la diabetes mellitus asociada con la obesidad. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para aumentar la frecuencia cardíaca. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para aumentar la velocidad metabólica basal (BMR). En otra modalidad, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para aumentar el gasto de energía. En otra modalidad, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y las composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para inducir la tolerancia a la glucosa. En otra modalidad, PEG-Fmoc-oxintomodulina y PEG-FMS-oxintomodulina y las

composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para inducir el control glicémico. En una modalidad, el control glicémico se refiere a niveles de glucosa en sangre no altos y/o no fluctuantes y/o niveles de hemoglobina glicosilada no altos y/o no fluctuantes.

En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para inhibir el aumento de peso. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para reducir los niveles de glucosa en sangre (Figuras 4A y 9). En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para disminuir la ingesta calórica. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para disminuir el apetito. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para controlar el peso. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para inducir o promover la pérdida de peso. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que las comprenden se utilizan para mantener uno cualquiera o más de un peso corporal deseado, un índice de masa corporal deseado, una apariencia deseada y buena

salud. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para controlar el perfil lipídico.

En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para reducir los niveles de triglicéridos. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para reducir los niveles de glicerol (Figura 9D).

10

En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan para reducir los niveles de colesterol. En una modalidad, la reducción de los niveles de colesterol es mayor que la reducción observada luego de la administración de OXM natural (Figura 9C). En una modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden reducen los niveles de colesterol en 60-70 %. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden reducen los niveles de colesterol en 50-100 %. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden reducen los niveles de colesterol en 25-90 %. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden reducen los niveles de colesterol en 50-80 %. En otra modalidad, PEG-

20

25

Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden reducen los niveles de colesterol en 40-90 %. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se utilizan  
5 para aumentar los niveles de colesterol HDL.

En una modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden usar a los efectos descritos en la presente sin una  
10 disminución significativa de la eficacia durante el transcurso de la administración (Figuras 5A, 6A y 7). En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 1 día. En otra modalidad, PEG-Fmoc-  
15 OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 2-6 días. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 1 semana. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-  
20 FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 2 semanas. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 3 semanas. En otra modalidad, PEG-  
25 Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 4

semanas. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 6 semanas. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 2 meses. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 4 meses. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 6 meses. En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden siguen siendo eficaces durante 1 año o más.

En una modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden usar a los efectos descritos en la presente y pueden ser eficaces inmediatamente tras la administración de la primera dosis (Figura 8A). En otra modalidad, PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y las composiciones farmacéuticas que los comprenden son eficaces después de que se han administrado dos o más dosis.

En otra modalidad, los métodos para utilizar PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los comprenden como se describe anteriormente en la presente se

aplican a un sujeto humano que sufre una enfermedad o afección que puede ser aliviada, inhibida y/o tratada por OXM. En otra modalidad, los métodos para utilizar PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los  
5 comprenden como se describe anteriormente en la presente son métodos veterinarios. En otra modalidad, los métodos para utilizar PEG-Fmoc-OXM y PEG-FMS-OXM y composiciones farmacéuticas que los comprenden tal como se describe anteriormente en la presente se aplican a animales tales  
10 como animales de granja, mascotas y animales de laboratorio. Por lo tanto, en una modalidad, un sujeto de la presente invención es felino, canino, bovino, porcino, murino, equino, etc.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar o reducir una enfermedad que se puede tratar o reducir por OXM o una formulación farmacéutica que la comprende, en un sujeto, que comprende el paso de administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente  
20 eficaz de PEG-Fmoc-OXM y/o PEG-FMS-OXM como se describe en la presente, tratando o reduciendo así una enfermedad que se puede tratar o reducir por OXM en un sujeto.

En otra modalidad, OXM, "péptido" o "proteína" como se usa  
25 en la presente abarcan péptidos naturales (ya sea productos de degradación, proteínas sintéticamente sintetizadas o

proteínas recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, proteínas sintetizadas sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de proteínas, que tienen, en algunas modalidades, modificaciones que hacen que las proteínas sean incluso más estables mientras están en el cuerpo, o más capaces de penetrar las células.

En otra modalidad, las modificaciones incluyen, de modo no taxativo, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación de enlace peptídico, incluyendo, de modo no taxativo,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{CH}_2\text{-S=O}$ ,  $\text{O=C-NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{S=C-NH}$ ,  $\text{CH=CH}$  o  $\text{CF=CH}$ , modificaciones de estructura principal y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que se incorpora mediante esta referencia como si se estableciera completamente en la presente. A continuación en la presente se proporcionan más detalles a este respecto.

En otra modalidad, los enlaces peptídicos ( $\text{-CO-NH-}$ ) dentro del péptido se sustituyen. En algunas modalidades, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados ( $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ). En otras modalidades, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces de éster ( $\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$ ).

En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces cetometileno ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ). En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces -aza ( $-\text{NH}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ ), donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ). En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces hidroxietileno ( $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ ). En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces tioamida ( $-\text{CS}-\text{NH}-$ ). En algunas modalidades, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces dobles olefínicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ). En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces retroamida ( $-\text{NH}-\text{CO}-$ ). En otra modalidad, los enlaces peptídicos se sustituyen por derivados de péptidos ( $-\text{N}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), donde R es la cadena lateral "normal", naturalmente presentada en el átomo de carbono. En algunas modalidades, estas modificaciones ocurren en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena de péptidos e incluso varias (2-3 enlaces) al mismo tiempo.

En una modalidad, los aminoácidos aromáticos naturales de la proteína tales como Trp, Tyr y Phe, se sustituyen por ácidos no naturales sintéticos tales como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados metilados con anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En otra modalidad, los péptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que

no son de aminoácido (por ejemplo, ácido graso, carbohidratos complejos, etc.).

En una modalidad, se entiende que "aminoácido" o  
5 "aminoácidos" incluyen los 20 aminoácidos de origen natural, los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente in vivo, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina y otros aminoácidos inusuales incluyendo, de modo no taxativo,  
10 ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. En una modalidad, "aminoácido" incluye tanto aminoácidos D como L.

En una modalidad, las OXM de la presente invención se  
15 utilizan en productos terapéuticos que requieren que la OXM esté en forma soluble. En otra modalidad, la OXM de la presente invención incluye uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales incluyendo, de modo no taxativo, serina y treonina que son capaces de aumentar la  
20 solubilidad de proteína debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

En una modalidad, la OXM de la presente invención se sintetiza bioquímicamente tal como usando técnicas de fase  
25 sólida estándar. En otra modalidad, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis de fase sólida exclusiva,

síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis de solución clásica.

En una modalidad, los procedimientos de síntesis de OXM de  
5 fase sólida son conocidos por los expertos en la técnica y  
se describen en más detalle por John Morrow Stewart and  
Janis Dillaha Young, Solid Phase Protein Syntheses (2ª Ed.,  
Pierce Chemical Company, 1984). En otra modalidad, las  
proteínas sintéticas se purifican por cromatografía líquida  
10 de alto rendimiento preparativo [Creighton T. (1983)  
Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman  
and Co. N.Y.] y cuya composición se puede confirmar  
mediante secuenciamiento de aminoácidos por métodos  
conocidos por los expertos en la técnica.

15

En otra modalidad, las técnicas de proteína recombinante se  
usan para generar la OXM de la presente invención. En  
algunas modalidades, las técnicas de proteína recombinante  
se usan para la generación de grandes cantidades de la OXM  
20 de la presente invención. En otra modalidad, las técnicas  
recombinantes se describen por Bitter et ál., (1987)  
Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier et ál. (1990)  
Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson et ál. (1984) Nature  
310:511-514, Takamatsu et ál. (1987) EMBO J. 6:307-311,  
25 Coruzzi et ál. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 y Brogli et ál.,  
(1984) Science 224:838-843, Gurley et ál. (1986) Mol. Cell.

Biol. 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463.

5 En otra modalidad, la OXM de la presente invención se sintetiza usando un polinucleótido que codifica la OXM de la presente invención. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la OXM de la presente invención está ligado a un vector de expresión, que comprende un  
10 control de transcripción de una secuencia de regulación en cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas modalidades, la secuencia de regulación en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de la OXM de la presente invención.

15

En una modalidad, la frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de cadena simple o doble que puede estar aislada y que se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido  
20 complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómica y/o secuencias de polinucleótido compuestas (por ejemplo, una combinación de lo que antecede).

En una modalidad, "secuencia de polinucleótido  
25 complementaria" se refiere a una secuencia que es el resultado de la transcripción inversa de ARN mensajero

usando una transcriptasa inversa o cualquier otra polimerasa de ADN dependiente de ARN. En una modalidad, la secuencia se puede amplificar posteriormente in vivo o in vitro usando una polimerasa de ADN.

5

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

10

En una modalidad, "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una modalidad, una secuencia compuesta puede incluir algunas  
15 secuencias exonales necesarias para codificar el péptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas que se interponen entre estas. En una modalidad, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes y típicamente incluirán  
20 secuencias de señal de corte y empalme conservadas. En una modalidad, las secuencias intrónicas incluyen elementos de regulación de expresión que actúan en cis.

En una modalidad, los polinucleótidos de la presente  
25 invención se preparan usando técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocidos por un experto en la

técnica. En algunas modalidades, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et ál., John Wiley & Sons, 1992).

5

En una modalidad, se puede usar una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión de hospedador para expresar la OXM de la presente invención. En otra modalidad, estos incluyen, de modo no taxativo, 10 microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plásmido o ADN cósmido que contiene la secuencia de codificación de proteína; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contiene 15 la secuencia de codificación de proteína; sistemas de célula de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico del coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido 20 recombinante, tales como plásmido Ti que contiene la secuencia de codificación de proteína.

En una modalidad, se usan sistemas de expresión no bacteriana (por ejemplo, sistemas de expresión de mamíferos 25 tales como células CHO) para expresar la OXM de la presente invención. En una modalidad, el vector de expresión usado

para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es un vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a la neomicina.

5 En otra modalidad, en los sistemas bacterianos de la presente invención, un número de vectores de expresión se puede seleccionar ventajosamente dependiendo del uso deseado para la proteína expresada. En una modalidad, se desean grandes cantidades de OXM. En una modalidad, se  
10 desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto de proteína, posiblemente como una fusión con una secuencia de señal hidrofóbica, que dirige el producto expresado al periplasma de la bacteria o el medio de cultivo donde el producto de proteína se purifica  
15 fácilmente. En una modalidad, determinadas proteínas de fusión son modificadas genéticamente con un sitio de escisión específico para ayudar a la recuperación de la proteína. En una modalidad, los vectores adaptables a tal manipulación incluyen, de modo no taxativo, la serie pET de  
20 vectores de expresión E. coli [Studier et ál., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

En una modalidad, se utilizan sistemas de expresión de levadura. En una modalidad, una cantidad de vectores que  
25 contienen promotores constitutivos o inducibles se pueden usar en levadura como se describe en la solicitud de

patente estadounidense N°: 5,932,447. En otra modalidad, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN exógeno en el cromosoma de levadura.

5 En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención puede también incluir secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un único ARNm, tal como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias  
10 para la integración genómica de la proteína quimérica promotora.

En una modalidad, vectores de expresión mamíferos incluyen, de modo no taxativo, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2  
15 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, disponibles en Invitrogen; pCI, disponible en Promega; pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV disponible en Strategene; pTRES disponible de Clontech, y sus derivados.

20

En otra modalidad, la presente invención utiliza vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas, tales como retrovirus. Vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En otra modalidad, los vectores que derivan  
25 del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores que derivan del virus Epstein Bar incluyen pHEBO,

y p205. Otros ejemplos de vectores incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMT010/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas en la dirección del promotor temprano de SV-40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus del tumor mamario murino, el promotor de sarcoma de Rous, promotor de poliedrina, u otros promotores eficaces para la expresión de células eucariotas.

10 En una modalidad, se utilizan vectores de expresión de plantas. En una modalidad, la expresión de la secuencia de codificación del agonista de receptor de glucagón/GLP1 doble (tal como la OXM) se transmite mediante un número de promotores. En otra modalidad, se utilizan promotores

15 virales tales como los promotores CaMV de ARN 35S y ARN 19S [Brisson et ál., Nature 310:511-514 (1984)], o el promotor de proteína de cobertura a TMV [Takamatsu et ál., EMBO J. 6:307-311 (1987)]. En otra modalidad, se utilizan promotores de plantas, tales como, por ejemplo, la

20 subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et ál., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); y Brogli et ál., Science 224:838-843 (1984)] o promotores de choque término, por ejemplo, soja hsp17.5-E o hsp17.3-B [Gurley et ál., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]. En una modalidad, se introducen

25 construcciones en células de plantas utilizando plásmido Ti, plásmido Ri, vectores virales de plantas,

transformación directa del ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas conocidas para el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 5 Sección VIII, páginas 421-463 (1988)]. Otros sistemas de expresión tales como los sistemas de célula hospedadora de insectos y mamíferos, conocidos en la técnica, también pueden ser utilizados por la presente invención.

10 Se comprenderá que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada (que codifica la proteína), la construcción de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias diseñadas para 15 optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad de la proteína expresada.

En algunas modalidades, se pueden utilizar varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente 20 invención en el sistema de célula hospedadora. En algunas modalidades, dichos métodos por lo general se describen en Sambrook et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et ál., Current Protocols in Molecular Biology, 25 John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et ál., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995),

Vega et ál., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por  
5 ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase las patentes estadounidenses Nros. 5,464,764 y 5,487,992 para métodos de selección positivos-negativos.

10

En una modalidad, se cultivan las células transformadas bajo condiciones eficaces, que permiten la expresión de grandes cantidades de OXM recombinante. En otra modalidad, las condiciones eficaces de cultivo incluyen, de modo no  
15 taxativo, condiciones eficaces del medio, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno, que permitan la producción de proteína. En una modalidad, un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir la OXM recombinante de la presente invención. En  
20 otra modalidad, un medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y las sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como las vitaminas, apropiados. En una modalidad, las células de la presente invención pueden  
25 cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, platos de

microtitulación y placas de petri. En otra modalidad, el cultivo se realiza a la temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuado para una célula recombinante. En otra modalidad, las condiciones de cultivo quedan a cargo de la experiencia de un experto en la técnica.

En una modalidad, dependiendo del vector y sistema hospedador utilizado en la producción, la OXM resultante de la presente invención permanece dentro de la célula recombinante, se secreta en el medio de fermentación, se secreta en un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplasmático en *E. coli*; o bien permanece en la superficie externa de la célula o membrana viral.

En una modalidad, luego de un tiempo de cultivo predeterminado, se realizará la recuperación de la OXM recombinante.

En una modalidad, la frase "recuperar la OXM recombinante", utilizada en la presente, refiere a recolectar la totalidad del medio de fermentación que contiene la OXM, y no implica pasos adicionales para la separación o purificación.

En una modalidad, se purifica la OXM de la presente invención utilizando una variedad de la técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, de modo no

taxativo, cromatografía por afinidad, cromatografía por intercambio de iones, filtrado, electroforesis, cromatografía por interacción hidrofóbica, cromatografía por filtrado de gel, cromatografía de fase inversa, 5 cromatografía por concanavalina A, cromatografía y solubilización diferencial.

En una modalidad, para facilitar la recuperación, la secuencia de codificación expresada puede ser diseñada para 10 codificar la proteína de la presente invención y fusionar la porción escindible. En una modalidad, una proteína de fusión puede ser diseñada de forma tal que la proteína pueda ser fácilmente aislada por cromatografía por afinidad; por ejemplo, mediante la inmovilización en una 15 columna específica para la porción escindible. En una modalidad, se diseña un sitio de escisión entre la proteína y la porción escindible, y la proteína puede liberarse de la columna cromatográfica por el tratamiento con la enzima o agente adecuado que escinde específicamente la proteína 20 de fusión en este lugar [por ejemplo, véase Booth et ál., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); y Gardella et ál., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)]. En otra modalidad, la OXM de la presente invención se recupera de forma "sustancialmente pura". En otra modalidad, la frase "sustancialmente pura" 25 se refiere a la pureza que permite el uso eficaz de la OXM en las aplicaciones descritas en la presente.

En una modalidad, el agonista de receptor de glucagón/GLP-1 doble de la presente invención también puede ser sintetizado utilizando sistemas de expresión *in vitro*. En  
5 una modalidad, los métodos de síntesis *in vitro* son conocidos por la técnica, y los componentes del sistema están comercialmente disponibles.

En otra modalidad, la actividad de unión *in vitro* se  
10 realiza midiendo la capacidad del agonista de receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado nativo, recombinante y/o inverso, como se describe en la presente, así como las composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo para tratar o mejorar enfermedades o afecciones, por ejemplo, de  
15 modo no taxativo: diabetes mellitus, obesidad, trastornos alimenticios, trastornos metabólicos, etc. En otra modalidad, se deduce la actividad *in vivo* por medidas conocidas de la enfermedad que se está tratando.

20 En otra modalidad, una dosis de OXM inversa pegilada de la presente invención comprende de 0,005 a 0,1 miligramos/kg de péptido OXM. En otra modalidad, una dosis de OXM inversa pegilada de la presente invención comprende de 0,005 a 0,5 miligramos/kg de péptido OXM. En otra modalidad, una dosis  
25 de OXM inversa pegilada de la presente invención comprende de 0,05 a 0,1 microgramos/kg de péptido OXM. En otra

modalidad, una dosis de OXM inversa pegilada de la presente invención comprende de 0,005 a 0,1 miligramos/kg de péptido OXM en una solución inyectable.

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

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

En otra modalidad, la OXM inversa pegilada de la presente invención puede proporcionarse a la persona misma. En una modalidad, la OXM inversa pegilada de la presente invención  
10 puede proporcionarse a la persona como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, una "composición farmacéutica" refiere a  
15 la preparación de OXM de acción prolongada, como se describe en la presente, con otros componentes químicos tal como los portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El objetivo de la composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.  
20 En otra modalidad, una OXM inversa pegilada es responsable del efecto biológico.

En otra modalidad, cualquiera de las composiciones de esta invención comprenderá al menos una OXM inversa pegilada. En  
25 una modalidad, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una modalidad, "una

preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido que los compañeros de combinación como se definieron anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de combinaciones fijas  
5 diferentes con cantidades diferenciadas de los compañeros de combinación, es decir, simultáneamente, concurrentemente, por separado o secuencialmente. En algunas modalidades, las partes del kit de partes pueden, por ej., administrarse simultáneamente o de forma  
10 escalonada crónicamente, que significa en diferentes momentos o con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquiera de las partes del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los compañeros de combinación, en algunas modalidades, puede administrarse en  
15 la preparación combinada. En una modalidad, la preparación combinada puede variar, por ej., para ajustarse a las necesidades de la subpoblación de un paciente a tratar o las necesidades de un solo paciente cuyas diferentes necesidades pueden deberse a una enfermedad, gravedad de  
20 una enfermedad, edad, sexo o peso corporal particular como puede determinarlo una persona experta en la técnica.

En otra modalidad, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se usan  
25 de manera intercambiable para referirse al portador o a un diluyente que no causa irritación importante al organismo y

que no detiene la actividad biológica y las propiedades del compuesto que ha sido administrado. Se incluye una adyuvante en estas frases. En una modalidad, uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente  
5 aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con una amplia gama de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter et ál. (1979).

10 En otra modalidad, "excipiente" refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar, adicionalmente, la administración de una OXN de acción prolongada. En otra modalidad, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios  
15 azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Se encuentran técnicas para la formulación y administración de fármaco en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack  
20 Publishing Co., Easton, PA, última edición, la cual se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

En otra modalidad, las vías de administración adecuadas del  
25 péptido de la presente invención, por ejemplo, incluyen administración oral, rectal, transmucosal, transnasal,

intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o  
5 intraoculares.

La presente invención también incluye OXM pegilada inversa para usar en la fabricación de un medicamento para administración por una vía periférica al cerebro para  
10 cualquiera de los métodos de tratamiento descritos anteriormente. Los ejemplos de vías periféricas incluyen la administración oral, parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosal, por ejemplo, bucal, sublingual, nasal, subcutánea o transdérmica,  
15 incluyendo la administración por inhalación. Las cantidades de dosis de OXM preferidas para los medicamentos se detallan a continuación.

La presente invención proporciona una composición  
20 farmacéutica que comprende OXM pegilada inversa y un portador farmacéuticamente adecuado, en una forma adecuada para la administración oral, rectal, parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, mucosal, por ejemplo, bucal, sublingual, nasal, subcutánea  
25 o transdérmica, incluyendo la administración por inhalación. Cuando se trata de formas de dosificación

unitarias, la dosis por unidad puede ser, por ejemplo, como se describe a continuación o según se calcule en función de las dosis por kg que se indican en lo sucesivo.

- 5 En otra modalidad, la preparación se administra de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra modalidad, una OXM pegilada inversa se formula en una forma de dosificación inyectable.

- La presente invención contempla diversas modalidades de intervalos de dosis: el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal durante 3 días (solo se proporciona el peso de la OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa dado que el tamaño del PEG puede diferir sustancialmente). En otra modalidad, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal durante 7 días. En otra modalidad, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de

peso corporal durante 10 días. En otra modalidad, el componente de péptido OXM dentro de la composición de OXM pegilada inversa se administra en un intervalo de 0,01-0,5 miligramos/kg de peso corporal durante 14 días. En otra

5 modalidad, sorprendentemente, la cantidad eficaz de OXM en una composición de OXM pegilada inversa es 1/4-1/10 de la cantidad eficaz de OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación inversa de OXM permite

10 limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente en al menos un 50 % en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente

15 en al menos un 70 % en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente en al menos un 75 % en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación

20 inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente en al menos un 80 % en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente en al menos un 85 % en comparación con la OXM libre. En otra modalidad, sorprendentemente, la pegilación

25 inversa de OXM permite limitar la cantidad de OXM recetada a un paciente en al menos un 90 % en comparación con la OXM libre.

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

En otra modalidad, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación eficaz en al menos 2 veces como la dosis semanal eficaz en al menos 2 veces, limitando así el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso del tratamiento con OXM. En otra modalidad, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la

frecuencia de dosificación eficaz en al menos 3 veces como la dosis semanal eficaz en al menos 3 veces, limitando así el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso del tratamiento con OXM. En otra modalidad, la

5 OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación eficaz en al menos 4 veces como la dosis semanal eficaz en al menos 4 veces, limitando así el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso del tratamiento con OXM. En otra

10 modalidad, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación eficaz en al menos 5 veces como la dosis semanal eficaz en al menos 5 veces, limitando así el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso del tratamiento con

15 OXM. En otra modalidad, la OXM pegilada inversa en comparación con la OXM libre reduce tanto la frecuencia de dosificación eficaz en al menos 6 veces como la dosis semanal eficaz en al menos 6 veces, limitando así el riesgo de eventos adversos y aumentando el cumplimiento con el uso

20 del tratamiento con OXM. En otra modalidad, la frecuencia de dosificación eficaz y la dosis semanal eficaz se basan en: (1) el peso del componente de OXM administrado dentro de la composición de OXM pegilada inversa; y (2) el peso del componente de OXM dentro de la composición de OXM libre

25 (OXM sin modificar).

En otra modalidad, los métodos de la invención incluyen el aumento del cumplimiento de los pacientes que padecen enfermedades crónicas que necesitan tratamiento con OXM. En otra modalidad, los métodos de la invención permiten la reducción en la frecuencia de dosificación de OXM mediante la pegilación inversa de OXM, como se describió anteriormente en la presente. En otra modalidad, el término cumplimiento comprende la adhesión. En otra modalidad, los métodos de la invención incluyen aumentar el cumplimiento de los pacientes que necesitan tratamiento con OXM mediante la reducción de la frecuencia de administración de OXM. En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración de la OXM se logra en virtud de la pegilación inversa que vuelve la OXM más estable y más potente. En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración de la OXM se logra como consecuencia de aumentar el  $T_{1/2}$  de la OXM. En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración de la OXM se logra como consecuencia de reducir la eliminación de OXM de la sangre. En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración de la OXM se logra como consecuencia de aumentar el  $T_{1/2}$  de la OXM. En otra modalidad, la reducción en la frecuencia de administración de la OXM se logra como consecuencia de aumentar la medida de AUC de la OXM.

25

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

20

En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez al día. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada dos días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada cuatro días. En otra

modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada cinco días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada seis días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez por semana. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 7-14 días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 5-15 días. En otra modalidad, una OXM pegilada se administra a un sujeto una vez cada 15-30 días.

En una modalidad, las variantes de OXM pegilada que se proporcionan en la presente reducen inesperadamente la glucosa junto con la reducción de los niveles de insulina en ayunas luego de la administración de una única dosis de la variante de PEG-OXM. En otra modalidad, las variantes de OXM pegilada proporcionadas en la presente llevan a un aumento en la sensibilidad del sujeto a la insulina (véase el Ejemplo 6).

La administración oral, en una modalidad, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, pastillas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitarias comprenden una cantidad segura y eficaz de OXM de

la invención, cada una de las cuales oscila, en una realización, entre alrededor de 0,7 o 3,5 mg y alrededor de 280 mg/70 kg, o en otra modalidad, entre alrededor de 0,5 o 10 mg y alrededor de 210 mg/70 kg. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitarias para administración oral se conocen en la técnica. En algunas modalidades, los comprimidos típicamente comprenden adyuvantes farmacéuticamente compatibles convencionales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una modalidad, pueden utilizarse deslizantes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una modalidad, pueden agregarse agentes colorantes, tales como los tintes FD&C, por razones de apariencia. Los edulcorantes y agentes saborizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores frutales, son adyuvantes útiles para los comprimidos masticables. Las cápsulas típicamente comprenden uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas modalidades, la selección de los componentes portadores depende de consideraciones secundarias como el sabor, el costo y la

estabilidad en almacenamiento, que no son cruciales a los efectos de esta invención y que un experto en la técnica puede realizar fácilmente.

- 5 En una modalidad, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una modalidad, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables de liberación prolongada. En una modalidad, la
- 10 forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una modalidad, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, pastillas o comprimidos masticables
- 15 de liberación inmediata. En una modalidad, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado de la OXM de acción prolongada como sabrá un experto en la técnica.
- 20 En otra modalidad, las composiciones para usar en los métodos de esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que en otra modalidad son soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y
- 25 opcionalmente otros compuestos, que se pretende se administren por la vía tópica intranasal. En algunas

modalidades, las composiciones comprenden entre alrededor de 0,001 % y alrededor de 10,0 % p/v de un compuesto objetivo, más preferentemente entre alrededor de 00,1 % y alrededor de 2,0, que se utiliza para la administración  
5 sistémica de los compuestos por la vía intranasal.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran mediante la inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular de una  
10 preparación líquida. En otra modalidad, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran de manera intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma  
15 adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran de manera intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se  
20 administran de manera intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se  
25 administran de manera tópica y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las

formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, la compuestos de la presente invención se combinan con uno o más agentes terapéuticos adecuados adicionales,  
5 preparados y aplicados como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la  
10 presente invención se fabrican mediante procesos conocidos en la técnica, por ej., por medio de procesos de mezclado, disolución, granulado, fabricación de grageas, levigado, emulsificación, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización convencionales.

15

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

25 En una modalidad, los inyectables de la invención se formulan en soluciones acuosas. En una modalidad, los

inyectables de la invención se formulan en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o amortiguador de sal fisiológico. En algunas modalidades, se utilizan penetrantes adecuados para  
5 penetrar la barrera en la formulación para la administración transmucosal. Tales penetradores generalmente se conocen en la técnica.

En una modalidad, las preparaciones que se describen en la  
10 presente se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En otra modalidad, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, opcionalmente con un  
15 conservante agregado. En otra modalidad, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

20 Las composiciones también comprenden, en otra modalidad, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como sodio edetato y otros; amortiguadores, tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad, tales como cloruro de sodio,  
25 cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, acetilcisteína,

metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; reguladores de viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y sus derivados; y alcohol polivinílico y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas  
5 según sea necesario. Las composiciones también comprenden, en algunas modalidades, anestésicos locales u otros agentes activos. Las composiciones pueden usarse como sprays, nebulizaciones, gotas y similares.

10 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en una forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de OXM de acción prolongada, en algunas modalidades, se preparan como  
15 suspensiones para inyección adecuadas a base de aceite o agua. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen, en algunas modalidades, aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o  
20 liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección contienen, en algunas modalidades, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. En otra modalidad, la suspensión también contiene estabilizantes o  
25 agentes adecuados que aumentan la solubilidad de la OXM de

acción prolongada para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En otra modalidad, el compuesto activo puede administrarse  
5 en una vesícula, particularmente un liposoma (véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et ál., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibídem, pp. 317-327; véase  
10 generalmente ibídem).

En otra modalidad, la composición farmacéutica administrada por un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche  
15 transdérmico, liposomas u otros métodos de administración. En una modalidad, se utiliza una bomba (véase Langer, anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et ál., Surgery 88:507 (1980); Saudek et ál., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989). En otra modalidad, se  
20 pueden usar materiales poliméricos. En aun otra modalidad, puede colocarse un sistema de liberación controlada próximo al objetivo terapéutico, es decir, el cerebro, haciendo necesaria solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled  
25 Release, anteriormente, tomo 2, pp. 115-138 (1984). Se

plantean otros sistemas de liberación controlada en la reseña de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

En una modalidad, la OXM de acción prolongada está en forma  
5 de polvo para constituirse con un vehículo adecuado, por  
ej., solución a base de agua libre de pirógenos, antes de  
su uso. En algunas modalidades, las composiciones se  
formulan para administración por atomización e inhalación.  
En otra modalidad, las composiciones están contenidas en un  
10 recipiente con medios de atomización adjuntos.

En una modalidad, la preparación de la presente invención  
se formula en composiciones rectales tales como  
supositorios o enemas de retención usando, por ej., bases  
15 para supositorios convencionales tales como manteca de  
cacao u otros glicéridos.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas adecuadas  
para usarse en el contexto de la presente invención  
20 incluyen composiciones donde la OXM de acción prolongada  
está contenida en una cantidad eficaz para lograr el  
objetivo deseado. En otra modalidad, una cantidad  
terapéuticamente eficaz significa una cantidad de OXM de  
acción prolongada eficaz para prevenir, aliviar o mejorar  
25 los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia  
del sujeto que está siendo tratado.

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

5

Las composiciones también comprenden conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como sodio edetato y otros; amortiguadores, tales como fosfato, citrato y acetato; 10 agentes de tonicidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, acetilcisteína, metabisulfito de sodio y otros; agentes aromáticos; reguladores de viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y sus 15 derivados; y alcohol polivinílico y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden anestésicos locales y otros agentes activos. Las composiciones pueden usarse como sprays, nebulizaciones, gotas y similares.

20

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables o componentes de estos son azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tal como almidón de maíz y almidón de papa; 25 celulosa y sus derivados, tal como metil celulosa, etil celulosa y carboximetil celulosa de sodio; tragacanto en

polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tal como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tal como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, 5 aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tal como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico; emulsionantes, tal como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tal como lauril sulfato de sodio; agentes colorantes; 10 agentes saborizantes; agentes para formar comprimidos, estabilizantes; antioxidantes; conservantes; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones amortiguadoras de fosfato. La elección del portador farmacéuticamente aceptable que se usará en conjunto con el 15 compuesto se determina básicamente por la forma en que el compuesto será administrado. Si el compuesto de la presente será inyectado, en una modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica estéril con un agente de suspensión compatible con la 20 sangre, cuyo pH se ajusta a alrededor de 7,4.

Además, las composiciones comprenden adicionalmente aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, 25 hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de

maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), amortiguadores (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de pH y fuerza iónica varios, aditivos  
5 tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeabilidad, agentes  
10 solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metilbisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la  
15 viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de  
20 magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio), fluidificantes (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, lauril sulfato de sodio),  
25 recubrimientos de polímero (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de

películas (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

Los componentes típicos de portadores para jarabes, 5  
elíxires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metilcelulosa, carboximetil celulosa de sodio, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), 10  
tragacanto y alginato de sodio; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y sorbitán óxido de polietileno (por ejemplo, polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato de sodio. En otra modalidad, las composiciones líquidas perorales también 15  
contienen uno o más componentes tales como endulzantes, agentes saborizantes y colorantes descritos anteriormente.

Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en partículas de 20  
compuestos poliméricos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos). Dichas composiciones influenciarán el estado físico, la 25  
solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo*.

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

En una modalidad, los compuestos modificados por la unión  
10 covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra modalidad, los compuestos modificados exhiben  
15 semividas sustancialmente más largas en sangre luego de inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes. En una modalidad, las modificaciones también aumentan la solubilidad de los compuestos en solución acuosa, eliminan la agregación, mejoran la  
20 estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En una modalidad, la actividad biológica *in vivo* deseada se logra mediante la administración de los aductos de dicho compuesto polimérico con menos frecuencia o en dosis  
25 menores que con el compuesto no modificado.

En otra modalidad, la preparación de una cantidad eficaz o dosis puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una modalidad, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para  
5 determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos.

En una modalidad, la toxicidad y la eficacia terapéutica del agonista a largo plazo (tal como OXM) como se describe  
10 en la presente puede determinarse mediante procedimientos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una modalidad, los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares e *in vitro* y los estudios en animales se pueden usar para formular un  
15 intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. En una modalidad, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una modalidad, el médico particular puede elegir la formulación, vía de administración y dosificación  
20 exactas en vista de la afección del paciente. [Véase, por ejemplo, Fingl, et ál., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1 p.1].

En una modalidad, dependiendo de la gravedad y grado de  
25 respuesta de la afección a ser tratada, la dosificación puede ser de una única o múltiples administraciones, donde

el transcurso del tratamiento dura desde varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se logra la disminución del estado de la enfermedad.

- 5 En una modalidad, la cantidad de una composición a ser administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la aflicción, la forma de administración, el criterio del médico tratante, etc.
- 10 En una modalidad, también se preparan composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulado en un portador farmacéutico compatible, se colocan en un recipiente apropiado y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.
- 15 En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se administra mediante administración sistémica. En otra modalidad, un agonista
- 20 del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se administra mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- En otra modalidad, un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se
- 25 describe en la presente es una preparación liofilizada (por ejemplo, deshidratada por congelación) en combinación con

excipientes orgánicos complejos y estabilizantes, tales como agente activos de superficie no iónicos (es decir, tensioactivos), varios azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina sérica humana. En otra modalidad, una composición

5 farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en agua estéril para inyección. En otra modalidad, una composición

10 farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en PBS estéril para inyección. En otra modalidad, una composición

15 farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente en NaCl al 0,9 % estéril para inyección.

En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o

20 pegilado inverso como se describe en la presente y portadores complejos como albúmina sérica humana, polioles, azúcares y agentes estabilizantes activos de superficie aniónicos. Véase, por ejemplo, WO 89/10756 (Hara et ál.- que contiene poliol y p-hidroxibenzoato). En otra

25 modalidad, la composición farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o

pegilado inverso como se describe en la presente y ácido lactobiónico y un amortiguador de acetato/glicina. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o  
5 pegilado inverso como se describe en la presente y aminoácidos, tales como arginina o glutamato que aumentan la solubilidad de composiciones de interferón en agua. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o  
10 pegilado inverso, como se describe en la presente y glicina o albúmina sérica humana (HSA), un amortiguador (por ejemplo, acetato) y un agente isotónico (por ejemplo, NaCl). En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble  
15 pegilado o pegilado inverso liofilizado como se describe en la presente y amortiguador de fosfato, glicina y HSA.

En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble  
20 pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente se estabiliza cuando se coloca en soluciones amortiguadas que tienen un pH entre alrededor de 4 y 7,2. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o  
25 pegilado inverso como se describe en la presente se estabiliza con un aminoácido como agente estabilizante y en

algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral con carga).

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

10

En otra modalidad, la composición farmacéutica que  
comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble  
pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente  
proporciona precisión de dosificación y seguridad del  
15 producto. En otra modalidad, la composición farmacéutica  
que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1  
doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la  
presente proporciona una formulación líquida, estable y  
biológicamente activa para usarse en aplicaciones de  
20 inyección. En otra modalidad, la composición farmacéutica  
comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble  
pegilado o pegilado inverso no liofilizado como se describe  
en la presente.

25 En otra modalidad, la composición farmacéutica que  
comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble

pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un extenso período de tiempo en estado líquido facilitando el almacenamiento y envío antes  
5 de la administración.

En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente  
10 comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra modalidad, la composición farmacéutica inyectable que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra  
15 modalidad, la producción de micropartículas lipídicas por congelación por atomización fue descrita por Speiser (Speiser y ál., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguido de nanopartículas lipídicas para administración peroral (Speiser EP 0167825 (1990)). En otra modalidad, los lípidos  
20 que se usan son bien tolerados por el cuerpo (por ejemplo, glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para nutrición parenteral).

En otra modalidad, la composición farmacéutica que  
25 comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente

está en forma de liposomas (J. E. Diederichs y ál., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).

En otra modalidad, la composición farmacéutica que  
5 comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble  
pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente  
comprende micropartículas poliméricas. En otra modalidad,  
la composición farmacéutica inyectable que comprende un  
agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o  
10 pegilado inverso como se describe en la presente comprende  
micropartículas poliméricas. En otra modalidad, la  
composición farmacéutica que comprende un agonista del  
receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado  
inverso como se describe en la presente comprende  
15 nanopartículas. En otra modalidad, la composición  
farmacéutica que comprende un agonista del receptor de  
glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se  
describe en la presente comprende liposomas. En otra  
modalidad, la composición farmacéutica que comprende una  
20 OXM pegilada o pegilada inverso como se describe en la  
presente comprende una emulsión lipídica. En otra  
modalidad, la composición farmacéutica que comprende un  
agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o  
pegilado inverso como se describe en la presente comprende  
25 microesferas. En otra modalidad, la composición  
farmacéutica que comprende un agonista del receptor de

glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas lipídicas. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble

5 pegilado o pegilado inverso como se describe en la presente comprende nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos anfifílicos. En otra modalidad, la composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso como se describe en la

10 presente comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un fármaco, una matriz lipídica y un tensioactivo. En otra modalidad, la matriz lipídica tienen un contenido de monoglicéridos que tiene al menos 50 % p/p.

15 En una modalidad, las composiciones de la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitarias que contienen el agonista del receptor de glucagón/GLP-1 doble

20 de acción prolongada. En una modalidad, el envase, por ejemplo, comprende una lámina metálica o de plástico, tal como un blíster. En una modalidad, el envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para su administración. En una modalidad, el envase o

25 dispensador está acompañado por un aviso asociado con el recipiente de forma prescrita por una agencia gubernamental

que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para la administración humana o veterinaria. Tal aviso, en una 5 modalidad, es el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos para fármacos recetados o de un prospecto de producto aprobado.

En una modalidad, se comprenderá que el agonista del 10 receptor de glucagón/GLP-1 doble pegilado o pegilado inverso de la presente invención se puede proporcionar al individuo con agentes activos adicionales para lograr un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente en sí mismo. En otra modalidad, 15 se toman mediciones (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) de los efectos secundarios adversos que se asocian con terapias de combinación.

Otros objetos, ventajas y rasgos novedosos de la presente 20 invención serán evidentes para un experto en la técnica tras examinar los ejemplos que siguen, que no pretenden ser taxativos. Además, cada una de las diversas modalidades y aspectos de la presente invención como se describen anteriormente en la presente y como se reivindican en la 25 sección de reivindicaciones que sigue tienen respaldo experimental en los ejemplos que siguen.

## EJEMPLOS

De modo general, la nomenclatura utilizada en la presente y  
5 los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente  
invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas,  
microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se  
explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por  
ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook  
10 et ál., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology"  
tomos I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et ál.,  
"Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and  
Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical  
Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York  
15 (1988); Watson et ál., "Recombinant DNA", Scientific  
American Books, Nueva York; Birren et ál. (eds) "Genome  
Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold  
Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las  
metodologías establecidas en las patentes estadounidenses  
20 N° 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057;  
"Cell Biology: A Laboratory Handbook", tomos I-III Cellis,  
J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of  
Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994),  
tercera edición; "Current Protocols in Immunology" tomos I-  
25 III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et ál. (eds), "Basic  
and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange,

Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están descritos extensamente e la bibliografía de patentes y científicas, véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N° 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et ál., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incoporan mediante esta referencia. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM

Síntesis de OXM: Oxintomodulina de secuencia:

5 HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNNIA (SEQ ID NO: 1) se sintetizó por el método de fase sólida que utiliza la estrategia de Fmoc a través del montaje de cadena de péptidos (Almac Sciences, Escocia). La secuencia de péptidos se montó usando los siguientes pasos: (1) Sellado:  
10 la resina se selló usando 0,5 M de solución de anhídrido acético (Fluka) en DMF (Rathburn); (2) Desprotección: el grupo protector de Fmoc se retiró de la cadena de péptido de crecimiento usando una solución de piperidina al 20 % v/v (Rathburn) en DMF (Rathburn); y (3) acoplamiento de  
15 aminoácidos: solución de 0,5 M de aminoácido (Novabiochem) en DMF (Rathburn) se activó usando una solución de HOBt 1M (Carbosynth) en DMF (Rathburn) y solución de DIC 1M (Carbosynth) en DMF (Rathburn). Se usaron cuatro equivalentes de cada aminoácido por acoplamiento.

20

El péptido bruto se escindió de la resina y los grupos protectores se retiraron agitando en un cóctel de Triisopropilsilano (Fluka), agua, dimetilsulfuro (Aldrich), yoduro de amonio (Aldrich) y TFA (Applied Biosystems)  
25 durante 4 horas. El péptido bruto se recogió luego por precipitación a partir de éter dietílico frío.

Purificación de péptidos: Se disolvió el péptido bruto en acetonitrilo (Rathburn)/agua (MilliQ) (5:95) y se cargó en una columna de HPLC preparativa. Los parámetros cromatográficos son los siguientes: Columna: Phenomenex Luna C18 250 mm x 30 mm, 15 µm, 300A; fase móvil A: agua + 0,1 % v/v de TFA (Applied Biosystems); fase móvil B: acetonitrilo (Rathburn) + 0,1 % v/v de TFA (Applied Biosystems); detección de UV: 214 o 220 nm; Gradiente: 25 % de B a 31 % de B por 4 volúmenes de columna y velocidad de flujo 43 mL/min.

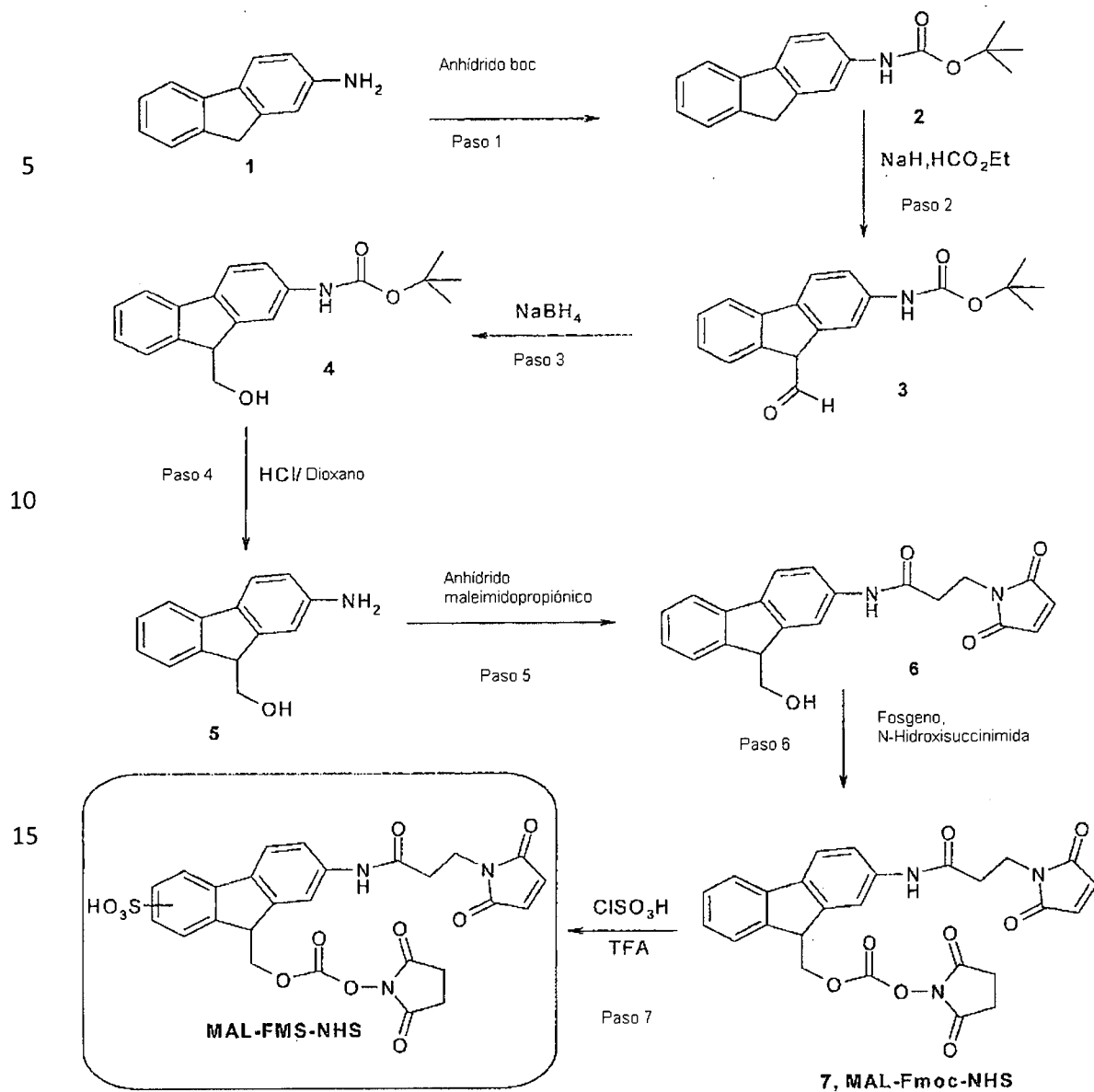
15

20

25

## Etapa 2 - síntesis de enlazador - síntesis de enlazador

### MAL-FMS-NHS:



20 La síntesis de los compuestos 2-5 se basó en los procedimientos descritos por Albericio et ál. en Synthetic Communication, 2001, 31(2), 225-232, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

25 2-(Boc-amino)fluoreno (2): 2-Aminofluoreno (18 g, 99 mmol) se suspendió en una mezcla de dioxano:agua (2:1) (200 ml) y

NaOH 2N (60 ml) en un baño de hielo con agitación magnética. Luego se agregó  $\text{Boc}_2\text{O}$  (109 mmol, 1,1 eq) y se siguió agitando a TA. La reacción se monitoreó por TLC ( $R_f=0,5$ , Hexano/ acetato de etilo 2:1) y el pH se mantuvo entre 5 9-10 mediante adición de NaOH 2N. Luego de que se completó la reacción, la suspensión se acidificó con  $\text{KHSO}_4$  1M hasta pH=3. La fase sólida se filtró y lavó con agua fría (50 ml), dioxano-agua (2:1) y luego se destiló azeotrópicamente con tolueno dos veces antes de usarla en el siguiente paso.

10

9-Formil-2-(Boc-amino)fluoreno (3): En un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, se suspendió NaH (60 % en aceite; 330 mmol, 3,3 eq) en THF seco (50 ml), una solución de 2-(Boc-amino)fluoreno del paso 2 (28 g; 100 mmol) en THF seco (230 15 ml) se agregó gota a gota durante 20 minutos. Se observó una suspensión espesa de color amarillo y la mezcla se agitó durante 10 minutos a TA bajo nitrógeno. Se agregó formato de etilo (20,1 ml, 250 mmol, 2,5 eq) gota a gota (precaución: evolución de gas). Luego la suspensión se 20 convirtió en una solución parda pálida. La solución se agitó durante 20 minutos. La reacción se monitoreó por TLC ( $R_f=0,5$ , hexano/acetato de etilo 1:1) y cuando solo se observaron rastros de material de partida, se inactivó con agua helada (300 ml). La mezcla se evaporó bajo presión 25 reducida hasta que se retiró la mayoría del THF. La mezcla resultante se trató con ácido acético hasta pH=5. El

precipitado blanco obtenido se disolvió en acetato de etilo y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y toda la capa orgánica se combinó y se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Luego de la filtración y la remoción de solvente, se obtuvo un sólido amarillo. Este material se utilizó en el siguiente paso.

9-Hidroximetil-2-(Boc-amino)fluoreno (4): El compuesto 3 se suspendió en MeOH (200 ml) y se agregó borohidruro de sodio en porciones durante 15 minutos. La mezcla se agitó durante 30 minutos (precaución: reacción exotérmica y evolución de gas). La reacción se monitoreó por TLC ( $R_f=0,5$ , hexano/EtOAc 1:1) y se completó. Se agregó agua (500 ml) y el pH se ajustó a 5 con ácido acético. El procesamiento implicó la extracción dos veces con acetato de etilo, lavado de las capas orgánicas combinadas con bicarbonato de sodio y salmuera, secado sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtración y concentración hasta sequedad. El producto bruto obtenido se purificó por cromatografía de matraz usando heptano/EtOAc (3:1) proporcionando una espuma amarilla (36 g, 97,5 % de pureza, se observaron rastros de acetato de etilo y éter dietílico en el  $^1\text{H-NMR}$ ).

9-Hidroximetil-2-aminofluoreno (5): el compuesto 4 se agregó a una solución helada de HCl 4N en dioxano. La

mezcla de reacción se dejó alcanzar TA y se agitó durante la noche. Se obtuvo un precipitado de color amarillo pálido. La suspensión se enfrió a 0 °C y se agitó más durante 5 horas. Luego de este momento, el sólido se filtró y se lavó minuciosamente con DCM (5 x 30 ml). Luego de secar, se obtuvo un sólido color amarillo pálido (20 g, 96,5 % de pureza) con un rendimiento total de 80 % en 3 pasos.

9-Hidroximetil-2-(amino-3-maleimidopropionato)fluoro (6): 9-Hidroximetil-2-aminofluoreno (5, 5,5 g, 26 mmol) y anhídrido maleimidopropiónico (6,93 g, 26 mmol) se colocaron en un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un agitador, un condensador de reflujo y un burbujeador de nitrógeno. La mezcla de reacción se sometió a reflujo a 85 °C durante 25 horas. TLC ( $R_f=0,25$ , Hexano/EtOAc 1:4) mostró que la reacción se había completado luego de este tiempo. La mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar un sólido de color amarillo. El producto se purificó por cromatografía en columna.

MAL-Fmoc-NHS (7): Un matraz de fondo redondo seco y limpio de 500 ml con agitación de varillas se cargó con trifosgeno (1,58 g, 0,35 eq.) en THF seco (55 ml) para formar una solución a ambiente. La solución se enfrió a alrededor de 0 °C con un baño de hielo/agua y se agregó una solución de

NHS (0,67 g, 0,38 eq) en THF seco (19 ml) gota a gota durante 10 minutos bajo nitrógeno a 0 °C. La solución resultante se agitó durante 30 minutos. Otra parte de NHS (1,34 g, 0,77 eq) en THF seco (36 ml) se agregó gota a gota a 0 °C durante 10 minutos y se agitó durante 15 minutos.

El compuesto 6 (5,5 g, 1 eq), THF seco (55 ml) y piridina (3,07 ml, 2,5 eq) se agitaron juntos para formar una suspensión. Esto se agregó a la solución de NHS en partes a 0-5 °C y luego se dejó ir a TA retirando el baño de hielo. Luego de 20 horas, la reacción se detuvo (todavía había material de partida presente, si la reacción se impulsa hasta completarse se observó impureza de dímero). La mezcla de reacción se filtró y al filtrado se le agregaron 4 % de salmuera (200 ml) y EtOAc (200 ml). Luego de la separación, la capa orgánica se lavó con ácido cítrico al 5 % (220 ml) y agua (220 ml). Luego se concentró la capa orgánica para dar 7,67 g de MAL-Fmoc-NHS bruto. El material se purificó por cromatografía en columna usando un gradiente de ciclohexano/EtOAc 70:30 a 40:60. Las fracciones que contienen producto se concentraron bajo vacío para dar 3,47 g (45 %) de MAL-Fmoc-NHS.

MAL-FMS-NHS (reacción de prueba): a una solución de MAL-Fmoc-NHS (100 mg, 0,2 mmol) en ácido trifluoroacético (10 ml), se agregó ácido clorosulfónico (0,5 ml). Luego de 15

minutos, se agregó éter dietílico helado (90 ml) y el producto se precipitó. El material se recogió por centrifugación, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. Se obtuvieron 41,3 mg (35 %) de sólido color beige.

5

### **Etapas 3 - conjugación**

Conjugación de PEG-Fmoc-OXM: La conjugación con PEG, Fmoc y OXM se llevó a cabo en una relación molar de 1:1:1, por ejemplo se agregó PEG40-SH (44 mg, en 4,4 ml de agua equivalente a 1,0  $\mu$ mol) a péptido (4,5 mg, equivalente a 1,0  $\mu$ mol) y se agregó NaHCO<sub>3</sub> (1M, 0,1 ml). Se agregó Fmoc (Almac, 10 mg/ml en DMF, 50  $\mu$ l) con agitación. La reacción se agitó durante 24 h a TA.

15

Conjugación de PEG-FMS-OXM: Todas las conjugaciones se realizaron a una relación molar de 1:1:1 entre el PEG, el enlazador y la OXM con los siguientes reactivos: PEG<sub>40</sub>-SH Y PEG<sub>30</sub>-SH (NOF), FMS (Almac), EMCS (Termo Scientific), OXM (Almac). Se disolvió PEG<sub>40</sub>-SH en 0,1 M de amortiguador de fosfato de sodio (Sigma) pH 7,2 a una concentración de 10 mg/mL. La solución se agregó a un equivalente de péptido de OXM purificado (Almac). Se disolvió un enlazador de MAL-FMS-NHS (Almac) en DMF a una concentración de 10 mg/mL, se agregó un equivalente a la reacción. La mezcla se agitó durante 30 minutos. La solución se neutralizó a pH 4 usando

ácido acético glacial (Fisher). La mezcla neutralizada se filtró (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se separó usando cromatografía preparativa. La mezcla de reacción se filtró y purificó por HPLC preparativa (Phenomenex Luna C18), se liofilizó y  
5 almacenó congelada.

Los parámetros cromatográficos son los siguientes: Columna: Phenomenex Luna C18(2) 250 mm x 30 mm, 15  $\mu\text{m}$  prep, 100A; fase móvil A: agua (MilliQ) + 0,1 % v/v de TFA (Applied Biosystems); fase móvil B: agua/acetonitrilo (Rathburn)  
10 (25:75) + 0,1 % v/v de TFA (Applied Biosystems); detección UV: 214 nm; Gradiente: 10 % de B a 65 % de B durante 41 minutos; y flujo: 43 mL/min.

15 El contenido de OXM se determinó usando análisis de aminoácido (AAA) o hidrólisis básica. Una cantidad definida de conjugado de OXM liofilizado se disolvió en agua a una concentración de 20 mg/mL. Luego se determinó la absorbancia a 280 nm y la concentración de acuerdo con la  
20 absorbancia a 280 nm se calculó usando  $\epsilon_{280}=29.700$ . La concentración del péptido se cuantificó con precisión por hidrólisis ácida de una alícuota seguido de análisis de aminoácido cuantitativo; la fracción ideal es la que tiene la relación más cercana entre la absorbancia calculada a  
25 280 nm y el contenido de péptido.

### Inducción de ensayo basado en células cAMP

Las células CHO-K1 que sobreexpresan el receptor GLP-1 (Millipore HTS163C2) se cosecharon en una placa blanca de media área y 96 pocillos (Greiner) a una densidad de 200.000 células/ml y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células se incubaron con concentraciones en aumento de OXM (ALMAC), PEG40-EMCS-OXM y PEG40-Fmoc-OXM con o sin suero de rata al 1 % (Bio reclamation). Las concentraciones de cAMP de las células se cuantificaron mediante ensayo HTRF (Cisbio 62AM4PEB) y el parámetro de EC50 se analizó mediante software PRISM.

### Estudio farmacocinético

El perfil farmacocinético de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM se evaluó de la siguiente manera: Se administraron ratas Wistar macho intravenosamente (IV) o subcutáneamente (SC) con una única dosis de OXM natural (n=9, 278 µg/kg) o con PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (n=6, 278 µg/kg de equivalente de péptido). Cohortes de 3 animales por grupo se desangraron en puntos de tiempo alternos. Se analizó la concentración de OXM en suero usando un kit comercial ELISA (Cat# S-1393, Bachem).

### Prueba de tolerancia a la glucosa IP

25

Ratones C57BL/6 macho se dejaron sin alimento durante la noche y se pesaron y se midieron los niveles de glucosa en sangre mediante muestreo de vena de la cola usando un glucómetro manual. Los ratones se inyectaron IP con PBS  
5 (vehículo), OXM (333 nmol/kg), PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM (OXM pegilada no inversa, 333 nmol/kg de contenido de péptido en peso corporal) y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido en peso corporal) y PEG<sub>40</sub>-Osu (546 nmol/kg) como control. Se administró glucosa (1,5 gr/kg) IP a los 15 min  
10 luego de la administración del artículo de prueba (vehículo, OXM y PEG<sub>40</sub>-Osu) o 120 min luego de la administración de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM. Los niveles de glucosa en sangre se midieron mediante muestreo de la vena de la cola antes de la administración de glucosa y 10, 20, 30, 60 y  
15 120 min luego de la administración de glucosa usando un glucómetro portátil.

#### Modelo de ratón de obesidad inducida por dieta

20 Estudio 1: Se albergaron ratones C57BL/6J (4-6 semanas de edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido), por grupos al llegar en jaulas de polipropileno. Todos los animales tuvieron acceso libre a una dieta alta en contenido graso (D12451; 45 % de kcal derivada de grasas;  
25 Research Diets, Nueva Jersey, EUA) y agua corriente en todo momento. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h de

luz-oscuridad de fase normal (las luces se prendieron a las 07:00). Los animales se expusieron a la dieta apropiada durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal promedio fue de aproximadamente 50 g). Posteriormente, los animales se albergaron solos en jaulas de polipropileno por un período de dos semanas más y se colocaron en período de luz de fase inversa (se apagaron las luces durante 8 h de 09:30 - 17:30 h). Durante la segunda semana de alojamiento simple, los animales comenzaron un protocolo de manejo de una vez por día y un período de referencia de 7 días. Posteriormente, los ratones se dosificaron con vehículo o fármaco de prueba como se proporciona a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1

|    |              |                                                                       |                   |          |
|----|--------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|
| 15 | <b>Grupo</b> | <b>Tratamiento (sc)</b>                                               | <b>Frecuencia</b> | <b>n</b> |
|    | A            | Vehículo (PBS)                                                        | b.i.d             | 10       |
|    | B            | OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (PBS)                               | b.i.d             | 10       |
|    | C            | Sibutramina 20 mg/kg (PBS)                                            | b.i.d             | 10       |
| 20 | D            | PEG40-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Días 1, 3, 5, 7   | 10       |
|    | E            | 556 mg/kg (27,8 mg/ml) PEG-SH (amortiguador de citrato rate buffer)   | Días 1, 3, 5, 7   | 10       |

Se realizaron las mediciones de peso corporal e ingesta de alimento diariamente hasta el Día 8. La medición final del

peso corporal se realizó el Día 12. La OXM y sibutramina se formularon en PBS mientras que PEG40-FMS-OXM o PEG-SH se formularon en 147 mM de NaCl 10 mM de amortiguador de citrato a pH 6. El contenido de OXM en PEG40-FMS-OXM se determinó mediante hidrólisis básica.

Estudio 2: El estudio 2 se realizó como se describe para el estudio 1. Luego de un período de referencia, los animales se dosificaron de acuerdo con el siguiente diseño descrito en la Tabla 2:

| Tabla  | Tratamiento (SC)                                                      | Frecuencia | n |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|------------|---|
| 2Grupo |                                                                       |            |   |
| A      | Vehículo (PBS)                                                        | b.i.d      | 8 |
| B      | OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (PBS)                               | b.i.d      | 8 |
| C      | PEG40-FMS-OXM 1000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,4,7  | 9 |
| D      | PEG40-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,4,7  | 9 |
| E      | PEG40-FMS-OXM 8000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,7    | 9 |

117

|    |   |                                                                        |           |   |
|----|---|------------------------------------------------------------------------|-----------|---|
| 5  | F | PEG40-EMCS-OXM 1000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,4,7 | 9 |
|    | G | PEG40-EMCS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,4,7 | 9 |
|    | H | PEG40-EMCS-OXM 8000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato) | Día 1,7   | 9 |
|    | I | PEG30-FMS-OXM 5000 nmol/kg de peso corporal (amortiguador de citrato)  | Día 1,4,7 | 9 |
|    | J | PEG40-SH (amortiguador de citrato)                                     | Día 1,4,7 | 9 |
| 10 | K | Sibutramina                                                            | b.i.d     | 8 |

Se realizaron las mediciones de peso corporal e ingesta de alimento diariamente hasta el Día 14.

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

20

Tabla 3

| 25 | Grupo | Tratamiento (sc)                         | n |
|----|-------|------------------------------------------|---|
|    | A     | PEG5-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Día 1, 8, 15  | 7 |
|    | B     | PEG30-FMS-6000 nmol/kg: Día 1, 8, 15     | 7 |
|    | C     | PEG40-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Día 1, 8, 15 | 7 |
|    | D     | PEG60-FMS-OXM 6000 nmol/kg: Día 1, 8, 15 | 7 |
|    | E     | Vehículo (PBS sc)                        | 7 |
|    | F     | Liraglutida (200 µg/kg bid) en PBS       | 7 |

## Datos y análisis estadístico

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

El peso corporal y la ingesta de alimento se expresan como valores promedio  $\pm$  SEM. El peso corporal, el aumento de peso corporal, los datos de ingesta de alimentos diaria y promedio y la ingesta de alimentos acumulativa se analizaron por ANCOVA con la referencia como covariante, seguido de comparaciones apropiadas (de dos colas) para determinar las diferencias significativas del grupo de control.  $P < 0,05$  se considera estadísticamente significativo. La referencia fue el valor del Día 1 para el peso corporal o el consumo promedio de alimento o agua durante el período de referencia.

20

### **EJEMPLO 1**

#### ***Síntesis y caracterización de PEG-Fmoc-OXM***

El péptido de OXM se sintetizó por el método de fase sólida que utiliza la estrategia de Fmoc a través del montaje de cadena de péptidos. El péptido se purificó por HPLC

preparativa usando una columna Phenomenex Luna C18 (250 x 30 mm) aplicando gradiente entre solución A (0,1 % TFA+H<sub>2</sub>O) y B (0,1 % TFA + MeCN). La pureza del péptido fue superior a 95 %, el peso molecular fue 4449 Da (medido por MALDI).

5 La conjugación del péptido OXM a PEG<sub>40</sub>-SH a través del enlazador Fmoc se realizó en presencia de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a TA seguido de filtración y purificación por HPLC preparativa (Jupiter C5). El peso molecular del conjugado se analizó por MALDI y

10 el contenido del péptido de OXM se analizó por AAA. El contenido de péptido de OXM promedio fue 189 µg OXM por 1 mg de conjugado PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM 132,4 µg de OXM por 1 mg de conjugado PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM, 61,7 µg de OXM por 1 mg de conjugado PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y 40 µg de OXM por 1 mg de

15 conjugado PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM.

## **EJEMPLO 2**

### ***Perfil farmacocinético de PEG10-Fmoc-OXM, PEG20-Fmoc-OXM y PEG40-Fmoc-OXM en comparación con OXM natural***

20

Se evaluó el perfil farmacocinético de OXM en comparación con PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM en ratas Wistar macho. A los animales se les administró una única inyección SC de OXM natural (278 µg/kg de péptido), PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM (278

25 µg/kg de contenido de péptido) o PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM (278 µg/kg de contenido de péptido). Se midió la concentración en

suero del compuesto en los intervalos de tiempo indicados (ELISA comercial, perfil PK que se muestra en la Figura 1 y parámetros PK no compartimentales convencionales se resumen en la Tabla 3). La pegilación inversa de OXM conjugada con PEG<sub>10</sub> y PEG<sub>20</sub> dio como resultado la prolongación de la semivida de OXM natural (0,15 hr para la OXM natural; 16,16 hr para PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM y 27,38 hr para PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM). La exposición, como lo refleja el parámetro de AUC, aumentó en alrededor de ~450 veces para PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM y en alrededor de ~2210 para PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM. Por lo tanto, la conjugación inversa de OXM con PEG<sub>20</sub> dio como resultado un efecto más prolongado en comparación con PEG<sub>10</sub>. Para caracterizar adicionalmente el perfil de PK de OXM conjugada inversamente con PEG<sub>40</sub> a través del enlazador de Fmoc, se inyectó IV o SC a ratas Wistar macho OXM natural o PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (278 µg/kg de contenido de péptido) y se analizó la concentración en suero en los momentos indicados (usando ELISA comercial, perfil de PK que se muestra en la Figura 2 y parámetros PK no compartimentales convencionales se resumen en la Tabla 4). Los resultados indicaron que la pegilación inversa prolonga la semivida del péptido de OXM en 100 veces, y aumentan la exposición significativamente, como se refleja mediante el parámetro de AUC. Además, la biodisponibilidad del péptido natural fue de solamente 4,37 % mientras que la administración de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM dio como resultado un 84 % de biodisponibilidad.

Tabla 3: Parámetros PK no compartimentales de OXM y PEG<sub>10</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>20</sub>-Fmoc-OXM luego de la administración SC a las ratas.

5

10

|                             | AUC<br>hr*ng/ml | T1/2 term.<br>hr | MRT<br>hr |
|-----------------------------|-----------------|------------------|-----------|
| OXM                         | 3,2             | 0,15             | 0,3       |
| PEG <sub>10</sub> -Fmoc-OXM | 1456            | 16,16            | 20,6      |
| PEG <sub>20</sub> -Fmoc-OXM | 7079            | 27,38            | 37,2      |

15

Tabla 4: Los parámetros PK de OXM y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM luego de la administración IV o SC a las ratas.

20

|                             | Vía de administración | AUC<br>hr*ng/ml | T1/2 term.<br>hr | MRT<br>hr | F<br>% |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------|--------|
| OXM                         | IV                    | 72,44           | 0,44             | 0,414     | 100    |
|                             | SC                    | 3,34            | 0,69             | 0,913     | ,374   |
| PEG <sub>40</sub> -Fmoc-OXM | IV                    | 435.73          | 23,3             | 24,3      | 100    |
|                             | SC                    | 656.65          | 30,4             | 57,7      | 4,68   |

25

### EJEMPLO 3

#### *Inducción de cAMP mediante OXM y OXM pegilada inversa*

Para evaluar la actividad in vitro de OXM en comparación  
5 con PEG40-Fmoc-OXM y PEG40-EMCS-OXM (OXM no pegilada  
inversa), células CHO-K1 que sobreexpresan el receptor GLP-  
1 se incubaron con concentraciones en aumento de los  
distintos compuestos seguido de cuantificación de cAMP. La  
OXM natural demostró la mejora de la actividad en  
10 comparación con PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM que presentó  
actividad in vitro comparable (EC<sub>50</sub> de  $2,53 \times 10^{-9}$ ,  $2,07 \times$   
 $10^{-6}$  y  $5,87 \times 10^{-7}$  para OXM, PEG40-EMCS-OXM y PEG40-Fmoc-  
OXM, respectivamente, Figura 3). De manera más importante,  
la pegilación de OXM no abrogó completamente la activación  
15 del receptor de GLP-1 inducida por OXM. Además, si bien la  
incubación de OXM en suero dio como resultado una reducción  
de la actividad, probablemente debido a la proteólisis  
parcial del péptido, se obtuvieron las actividades  
comparables en la presencia y ausencia de suero de ratas  
20 para PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM, lo que sugiere que la  
pegilación enmascara los sitios de proteólisis potenciales  
en OXM.

#### **EJEMPLO 4**

##### ***La OXM de acción prolongada pegilada inversa indujo la tolerancia a la glucosa***

5 Para evaluar la actividad in vivo de OXM o PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM, se aplicó el modelo IPGTT. Se inyectó péptido de OXM o PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM IP a ratones C57BL/6 seguido de inyección IP de glucosa y se midieron los niveles de glucosa en sangre de la vena de la cola mediante glucómetro. Se administraron

10 IP OXM (333 nmol/kg), PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM (OXM no pegilada inversa, 333 nmol/kg de contenido de péptido de peso corporal) y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM (202 nmol/kg de contenido de péptido de peso corporal) 15 min (OXM y PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM) o 2 horas PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM, antes de la inyección IP de glucosa

15 (1,5 gr/kg). La inducción de la tolerancia a la glucosa se comparó con el grupo de vehículo. Como control para el efecto de PEG<sub>40</sub>, se administró PEG<sub>40</sub>-Osu (546 nmol/kg) a un grupo de control. Si bien el péptido de OXM tenía un efecto menor sobre la tolerancia a la glucosa en comparación con

20 el grupo de vehículo, la administración de PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM con un contenido molar de OXM aun menor dio como resultado tolerancia a la glucosa inducida (Figura 4). Sorprendentemente, la administración de no pegilada inversa dio como resultado la inducción de la tolerancia a la

25 glucosa, lo que sugiere que OXM pegilada es farmacológicamente activa in vivo.

### **EJEMPLO 5**

***La OXM de acción prolongada pegilada inversa reduce el peso corporal e inhibe la ingesta de alimento en ratones DIO***

5

La actividad farmacológica de OXM se evaluó adicionalmente en ratones DIO luego de la inyección SC de OXM natural, y OXM pegilada inversa. En el estudio 1, se administraron 5000 nmol/kg de peso corporal de OXM b.i.d o PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM que contiene 5000 nmol/kg de peso corporal de OXM cada dos días durante siete días de dosificación a ratones DIO macho (n=10 por grupo). Se midieron el peso corporal y la ingesta de alimento a diario durante 8 días con una última medición del peso corporal el día 12. Dos veces al día, la inyección de OXM dio como resultado una reducción moderada tanto en el peso corporal (6 % de pérdida de peso el Día 8 en comparación con el grupo de control de vehículo) e inhibición estadísticamente significativa de la ingesta de alimento. Por otro lado, la administración de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM con el mismo contenido de péptido de OXM por dosis pero inyectado cada dos días dio como resultado una notoria pérdida de peso (pérdida de peso de 24 % el Día 8 en comparación con el grupo de control PEG-SH) y manifestó una inhibición considerable de la ingesta de alimento (Figura 4). Sibutramina, inhibidor de la reabsorción de los neurotransmisores, que se usó como control positivo redujo

el peso corporal en un 15,6 %. Cabe destacar que la reducción del peso corporal en el grupo de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM fue constante hasta la última medición el Día 12 que son 5 días luego de la última dosis, lo que indica un comportamiento duradero de OXM pegilado inverso (Figura 5).

Dado que PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM indujo la tolerancia a la glucosa en el modelo IPGTT, fue importante comparar la eficacia de OXM no pegilada inversa con OXM pegilada inversa en el contexto del peso corporal y la ingesta de alimento. Por consiguiente, se diseñó un estudio de seguimiento para abordar este asunto (estudio 2 en los Materiales y métodos). Si bien la administración de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM cada 3 días (total de 3 inyecciones) dio como resultado una reducción considerable del peso corporal, la inyección de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM en la misma frecuencia dio como resultado un efecto insignificante en el peso corporal. Cabe destacar que una única inyección el Día 1 de 8000 nmol/kg de peso corporal de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM dio como resultado una reducción de peso evidente durante 6 días. Sorprendentemente, la administración de 5000 nmol/kg de peso corporal de PEG<sub>30</sub>-FMS-OXM dio como resultado una reducción elevada del peso corporal, lo que indica una mayor eficacia en comparación con PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM (Figura 6).

OXM es un péptido potencial para el tratamiento de los trastornos metabólicos, tales como diabetes y obesidad, tal como se demostró mediante el peso perdido obtenido por la OXM natural en sujetos sanos con sobrepeso y obesos (Wynne et ál, 2005). Sin embargo, debido a la corta semivida del péptido y su baja estabilidad in vivo, se requieren administraciones diarias repetidas de las dosis suprafisiológicas para alcanzar un efecto farmacológico en humanos. Esta patente proporciona un medio eficaz para estabilizar OXM en condiciones fisiológicas pegilando de forma inversa la acción de la OXM, haciéndola de acción prolongada. Inesperadamente, la OXM modificada, la versión pegilada, es activa y no es un simple profármaco.

La OXM pegilada de forma inversa demostró un perfil farmacocinético superior en ratas con un aumento sustancial en la exposición y semivida prolongada en comparación con la OXM natural. Al comparar el efecto de PEG con varios pesos moleculares conjugado de forma inversa con OXM en el perfil PK de OXM, el conjugado PEG<sub>40</sub> demostró un efecto prolongado superior en comparación con PEG<sub>10</sub> o PEG<sub>20</sub>. Por lo tanto, el PEG<sub>40</sub> se evaluó adicionalmente en estudios farmacológicos (Figuras 1 y 2). De forma importante, la biodisponibilidad de OXM aumentó significativamente de 4,37 % a 84,6 % luego de la administración SC de PEG40-Fmoc-OXM, lo que contribuye a la mayor exposición del péptido

pegilado de forma inversa (Tabla 2). PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM mejoró la tolerancia a la glucosa en comparación con OXM natural, según se evaluó en un modelo IPGTT de ratones C57BL/6 no alimentados durante la noche. En este modelo, una OXM no  
5 pegilada inversa conjugada con PEG<sub>40</sub> (PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM) demostró actividad de inducción de la tolerancia a la glucosa comparable con el PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM. Este resultado también es respaldado por la actividad in vitro observada para PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM y PEG<sub>40</sub>-Fmoc-OXM donde la pegilación  
10 convencional de OXM no elimina por completo la unión de OXM a su receptor, un fenómeno observado para los péptidos pegilados debido a la interferencia estérica, y por consiguiente, no da como resultado una pérdida total de la actividad biológica (Figuras 3 y 4).

15

A continuación, se evaluó el efecto de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM en el peso corporal y la ingesta de alimento en ratones DIO en comparación con la OXM natural. La inyección SC de 5000 nmol/kg de OXM natural administrada dos veces al día dio  
20 como resultado una reducción moderada del peso corporal y la ingesta de alimento luego de 7 días de dosificación. A diferencia de esto, la inyección de 5000 nmol/kg de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM cada dos días dio como resultado una notoria reducción del peso corporal y la ingesta de alimento (6 % y  
25 24,9 % de reducción del peso corporal para OXM y PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM, respectivamente, Figura 5), en comparación con el

control el Día 8. En conclusión, PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM demostró un efecto antiobesidad prolongado y una mejor eficacia considerando que la dosis cumulativa de OXM administrada durante el estudio para PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM fue de casi 4 veces  
5 más baja en comparación con el grupo al que se le administró OXM natural.

OXM no pegilada inversa, PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM, demostró mejorar la tolerancia a la glucosa en la prueba IPGTT. Por lo  
10 tanto, era imperativo evaluar la actividad de regulación de alimento de la pegilación convencional en comparación con la OXM pegilada de forma inversa y la OXM natural en el modelo DIO. La administración de 5000 nmol/kg de PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM cada tres días dio como resultado una reducción  
15 insignificante del peso corporal si bien la inhibición de la ingesta de alimento fue evidente hasta 3 días luego de la dosificación (Figura 6). La inhibición moderada de la ingesta de alimento probablemente es el resultado de la actividad directa de OXM en el tracto gastrointestinal y se  
20 correlaciona con la actividad periférica observada en el modelo IPGTT. Dado que la actividad de la regulación de alimento de OXM implica el cruzamiento de la barrera hematoencefálica y la unión a los receptores en las neuronas en el ARC, es imperativo que no se elimine la  
25 capacidad de OXM de penetrar el CNS. La bioactividad periférica observada de PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM en oposición a la

falta de capacidad de este compuesto de reducir el peso corporal de ratones DIO sugiere que la unión covalente al resto PEG restringe la capacidad de PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM de pasar a través de BBB hacia ARC que es el sitio de acción  
5 potencial de OXM en el hipotálamo. A diferencia de esto, la inyección de 5000 nmol/kg de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM en la misma frecuencia redujo notoriamente el peso corporal e inhibió la ingesta de alimento en un 20 %, según se midió el día 12. Cabe destacar que la inyección de 8000 nmol/kg de  
10 PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM una vez a la semana dio como resultado una reducción similar del peso corporal en un 20 %, lo que indica que en humanos, se puede lograr una pérdida de peso significativa mediante la inyección una vez a la semana o incluso con menor frecuencia de dosificación de OXM  
15 pegilada de forma inversa.

La estrategia de pegilación inversa pretende superar la pérdida de actividad observada a menudo en la pegilación convencional a la vez que mantiene el efecto prolongado del  
20 fármaco. En los casos en que la bioactividad del profármaco pegilado se pierde drásticamente o incluso se elimina, se analizó anteriormente la ventaja de aplicar pegilación inversa (patentes estadounidense N° 7585837). Sin embargo, se desconoce cuál será la eficacia de un profármaco  
25 pegilado de forma inversa en comparación con el fármaco no pegilado inverso covalentemente que mantiene su actividad

biológica. Esto es especialmente pertinente ya que se espera que el perfil de PK del péptido covalentemente pegilado sea superior en comparación con el péptido pegilado inverso cuando se evalúa las concentraciones en sangre del conjugado, debido a la liberación lenta del péptido desde el conjugado. PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM demostró ser activo tanto in vitro como en el modelo IPGTT in vivo. Por lo tanto, fue posible que esta molécula también indujera la saciedad y redujera el peso corporal luego de la administración SC a ratones. Sin embargo, esto demostró ser incorrecto ya que PEG<sub>40</sub>-EMCS-OXM no reduce el peso corporal en ratones DIO mientras que PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM tuvo un efecto notorio. La publicación anterior presentó datos conflictivos con respecto a la contribución de la actividad periférica de OXM y la actividad del CNS de OXM. Por un lado, las acciones anoréxicas de OXM ip fueron bloqueadas mediante la administración anterior de intra-ARC de GLP-1R, exendina<sub>9-39</sub> lo que indica la importancia de la actividad relacionada con el CNS de OXM (Dakin et ál 2004). Sin embargo, una administración oral de Bifidobacterium que expresa OXM a ratones con sobrepeso dio como resultado una reducción en el peso corporal si bien la OXM no se detectó en el plasma de estos ratones, lo que sugiere que la activación directa de las células gastrointestinales es importante para la actividad de la pérdida de peso de OXM (Long et ál, 2010). Como se mencionó anteriormente, la

falta de información sobre el modo de acción de OXM y el impacto de la pegilación, hace que sea imposible predecir cuál será la eficacia de la OXM pegilada de forma inversa en comparación con la OXM natural y OXM pegilada unida  
5 covalentemente.

La eficacia superior de PEG<sub>30</sub>-FMS-OXM en comparación con PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM, como se muestra en el estudio 2, fue sorprendente. Si bien no se evaluó el perfil PK de PEG<sub>30</sub>-FMS-OXM, el perfil PK de PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM fue claramente  
10 superior a PEG<sub>10</sub>-FMS-OXM y PEG<sub>20</sub>-FMS-OXM. Es posible que el uso de PEG<sub>30</sub> presente el tamaño de PEG favorable que por un lado reduce significativamente la eliminación renal del PEG<sub>30</sub>-FMS-OXM conjugado, a la vez que facilita la velocidad  
15 de hidrólisis de OXM desde el conjugado que permite una presencia sostenida de OXM requerida para provocar sus actividades farmacológicas.

### **Estudio 3**

20 En este estudio, se evaluó la conjugación de OXM con PEG de varios tamaños. Como se muestra en los estudios anteriores, la administración de PEG<sub>30</sub>-FMS-OXM y PEG<sub>40</sub>-FMS-OXM una vez a la semana tuvo un efecto notorio en el peso corporal. Sorprendentemente, PEG<sub>5</sub>-FMS-OXM perdió por completo la  
25 capacidad de inducir la pérdida de peso en comparación con el grupo de vehículo, mientras que PEG<sub>60</sub>-FMS-OXM indujo una

reducción incluso más pronunciada que PEG30-FMS-OXM. La diferencia en la pérdida de peso entre PEG30-FMS-OXM y PEG40-FMS-OXM es este estudio se encuentra dentro del intervalo de variabilidad del experimento y no fue  
5 significativa.

#### **EJEMPLO 6**

##### ***Perfiles glicémicos y lipídemicos mejorados en ratones obesos tratados con OXM PEGilada inversa***

10

#### Materiales y métodos

#### Procedimientos experimentales para el modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta (DIO):

El modelo DIO se llevó a cabo en RenaSci Ltd Company  
15 (Nottingham, Reino Unido). Ratones C57BL/6J (4-6 semanas de edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido) se expusieron a una dieta alta en grasas (D12451; 45 % de kcal derivadas de grasa; Research Diets, Nueva Jersey, EUA) durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal  
20 promedio sea de aproximadamente 50 g). Dos semanas antes de la administración del fármaco, los animales se albergaron solos y se colocaron en iluminación de fase inversa (oscuridad durante 8 horas de 09:30 - 17:30 h). Durante la primera semana de un único alojamiento (período de manejo),  
25 los animales comenzaron un protocolo de manejo de una vez al día y durante la segunda semana (período de referencia),

recibieron una dosificación del vehículo apropiado b.i.d. o una vez a la semana a medida que recibieron la dosificación durante el período de tratamiento) mediante una vía subcutánea. 7 grupos (n = 8) de ratones DIO recibieron una dosificación durante 29 días, de la siguiente manera:

10

15

20

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

Durante el período de referencia y de tratamiento, se registraron a diario la ingesta de alimento, el consumo de agua y el peso corporal. Los días 1 y 22 luego de una referencia de dos semanas, ninguno de los ratones recibió alimento durante la noche. Los días 2 y 23, los ratones se

134

sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Cada animal recibió una dosificación del vehículo o compuesto de prueba y 60 minutos después recibieron una dosificación de D-glucosa (2 g/kg po). Se tomaron muestras  
5 de sangre de referencia inmediatamente antes de la dosificación del vehículo o compuesto de prueba (B1) e inmediatamente antes de la carga de glucosa (B2). Se tomaron otras muestras de sangre 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos luego de la administración de glucosa. Todas las  
10 muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y analizaron para determinar la glucosa (n = 2) e insulina (n = 1) usando el reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y Alpco mouse ultrasensitive insulin ELISA (80-  
15 INSMSU-E10), respectivamente. El Día 30, se recogieron las muestras de plasma terminal (24 horas luego de la dosis final el Día 29) mediante punción cardíaca y se analizaron para determinar la insulina, glucosa, colesterol y triglicéridos usando el mouse ultrasensitive insulin ELISA  
20 (80-INSMSU-E10), reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421), reactivo de colesterol Thermoelectron Infinity (TR13421) y el kit Sigma Triglyceride (TR0100). Se registraron los pesos de cadáver finales luego del muestreo de sangre terminal y los cadáveres se congelaron a -20 °C.

25

Procedimientos experimentales para estudios de composición corporal:

Se determinaron los niveles de grasa corporal, proteína, agua y ceniza de los cadáveres usando las técnicas de análisis químicos estándar. Solamente se midió el contenido de grasa, proteína, agua y ceniza, dado que otros componentes (principalmente carbohidrato) forman menos del 2 % de la composición corporal total. Se determinó el agua del cadáver liofilizando los cadáveres de ratón hasta un peso constante. Luego, los cadáveres secos se molieron en un molino de laboratorio listo para los análisis posteriores. Se determinó la grasa del cadáver en las muestras liofilizadas usando un protocolo de extracción Soxhlet modificado (éter de petróleo a 40-60 °C) con un sistema Tecator Soxtec 2050 (Foss UK Ltd, Wheldrake, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se determinó la proteína del cadáver usando un procedimiento micro-Kjeldahl en las muestras liofilizadas usando un bloque de digestión Tecator 2012 y unidad de destilación 2200 (Foss UK Ltd). Se determinó la ceniza residual del cadáver calentando las muestras liofilizadas a altas temperaturas usando un horno de mufla de cenizas.

Datos y análisis estadístico:

Los pesos corporales, la ingesta de alimento y el consumo de agua se expresaron como valores promedio  $\pm$  SEM. El peso

corporal, el aumento de peso corporal, los datos de ingesta de alimento y consumo de agua diarios y promedio y la ingesta de alimento cumulativa se analizaron por ANCOVA con la línea de referencia como covariante, seguido de 5 comparaciones apropiadas (de dos colas) para determinar las diferencias significativas del grupo de control.  $P < 0,05$  se considera estadísticamente significativo. La referencia fue el valor del Día 1 para el peso corporal o el consumo promedio de alimento o agua durante el período de 10 referencia.

Se analizaron la insulina en plasma, colesterol y triglicéridos terminal mediante un modelo lineal general con tratamiento como factor y orden de hemorragia y peso 15 corporal de referencia como covariantes seguido de comparaciones apropiadas (dos colas) para determinar las diferencias significativas con el grupo de vehículo pertinente. Se usaron técnicas de transformación logarítmica y/o regresión robusta, de ser apropiado.

20

Los datos para cada parámetro de composición corporal (grasa, proteína, agua y ceniza) se presentaron como g/cadáver y % total. Los pesos de cadáver finales también se analizaron como comparación directa. El análisis se 25 realizó mediante regresión robusta con el tratamiento como factor y el peso corporal en la línea de referencia como

covariante, seguido de múltiples pruebas de comparaciones apropiadas (dos colas) para comparar los efectos de cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo pertinente.

## 5 Resultados

Una inyección semanal de PEG30 inverso (PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg; amortiguador de citrato)) o PEG40 inverso (PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg; amortiguador de citrato)), durante un período de 30 días, proporcionó 28 % y 23 % de  
10 pérdida de peso, respectivamente, en comparación con el 17 % de pérdida de peso para el grupo al que se le inyectó oxintomodulina natural dos veces al día (Figura 7) - mientras que la dosificación cumulativa de oxintomodulina neta a la que se inyectó PEG30 inverso fue de solamente 8,6  
15 % para el período de 30 días. OXM PEGilada de forma no inversa (PEG40-EMCS-OXM y PEG30-EMCS-OXM) fueron incluso menos eficaces para reducir el peso corporal.

La tolerancia a la glucosa en ratones DIO luego de  
20 inyecciones semanales con OXM PEGilada inversa (PEG30-FMS-OXM o PEG40-FMS-OXM) fue comparable con la tolerancia a la glucosa provocada mediante una inyección dos veces al día de oxintomodulina natural el Día 2 (Figura 8A) y el Día 23 (Figura 8B).

25

Además, la administración una vez a la semana de OXM PEGilada inversa mejoró los perfiles glicémicos y lipídicos en ratones DIO, lo que demostró una reducción de la glucosa terminal (Figura 9A), una reducción de la insulina terminal (Figura 9B), una reducción del colesterol terminal (Figura 9C) y una reducción del glicerol terminal (Figura 9D).

Finalmente, un análisis de composición corporal de los ratones DIO demostró que la pérdida de peso demostrada mediante los ratones tratados con OXM PEGilada inversa fue el resultado de una reducción específica de la grasa (Figura 10).

En su conjunto, la PEGilación inversa mostró ser segura y tolerable en distintos modelos animales de roedores toxicológicos. La PEGilación inversa también permite la prolongación de la semivida de OXM, mientras se mantiene su potencial para penetrar los tejidos diana (por ejemplo, penetrar el BBB).

20

La OXM PEGilada de forma inversa demostró propiedades de acción prolongada superiores, respaldando la inyección una vez a la semana en los humanos. La OXM PEGilada de forma inversa redujo el peso corporal mediante una reducción específica de la grasa (evaluación de la composición corporal). La OXM PEGilada de forma inversa mejoró los

perfiles glicémicos y lipídicos. Se espera que OXM  
PEGilada de forma inversa proporcione una terapia a largo  
plazo para los pacientes con obesidad y diabetes tipo II  
mediante sus efectos impactantes sobre la actividad  
5 glicémica y la pérdida de grasa.

### **EJEMPLO 7**

#### **Efecto de OXM pegilada inversa en el nivel de glucosa y 10 secreción de insulina**

Procedimientos experimentales para el modelo de ratón con  
obesidad inducida por la dieta (DIO):

El modelo DIO se llevó a cabo en RenaSci Ltd Company  
15 (Nottingham, Reino Unido). Ratones 57BL/6J (4-6 semanas de  
edad, Harlan UK Limited, Bicester, Oxon, Reino Unido) se  
expusieron a una dieta alta en grasas (D12451; 45 % de kcal  
derivadas de grasa; Research Diets, Nueva Jersey, EUA)  
durante al menos 6 meses (hasta que el peso corporal  
20 promedio fue de aproximadamente 50 g). Dos semanas antes de  
la administración del fármaco, los animales se albergaron  
solos, donde comenzaron un periodo de aclimatación. En la  
primera semana, el periodo de manejo, los animales  
comenzaron un protocolo de manejo de una vez al día y  
25 durante la segunda semana, periodo de referencia,  
recibieron una dosificación del vehículo apropiado (b.i.d.

o una vez a la semana a medida que recibieron la dosificación durante el período de tratamiento) mediante una vía subcutánea. Durante el período de referencia y de tratamiento, se registraron a diario la ingesta de alimento, el consumo de agua y el peso corporal. En la mañana del día 1, los ratones recibieron una dosificación seguido de ayuno durante la noche. El día 2, 24 horas luego de la administración (grupos A-E) o antes de la dosificación de la mañana (grupos F-H), los ratones se muestrearon para la glucosa en ayuno y la insulina en ayuno. Todas las muestras de sangre (aproximadamente 20 µl) se tomaron de la vena de la cola. Las muestras de plasma se prepararon y analizaron para determinar la glucosa (n = 2) e insulina (n = 1) usando el reactivo de glucosa Thermoelectron Infinity (TR15421) y Alpco mouse ultrasensitive insulin ELISA (80-INSMSU-E10), respectivamente.

### Resultados

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

| Grupo | Tratamiento (SC)               | Frecuencia               |
|-------|--------------------------------|--------------------------|
| A     | PEG40-SH (662 mg/kg)           | Única inyección el día 1 |
| B     | PEG40-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg) | Única inyección el día 1 |
| C     | PEG30-EMCS-OXM (6.000 nmol/kg) | Única inyección el día 1 |

5

|   |                               |                          |
|---|-------------------------------|--------------------------|
| D | PEG40-FMS-OXM (6.000 nmol/kg) | Única inyección el día 1 |
| E | PEG30-FMS-OXM (6.000 nmol/kg) | Única inyección el día 1 |
| F | Vehículo (PBS)                | b.i.d                    |
| G | OXM (6.000 nmol/kg; PBS)      | b.i.d                    |
| H | Liraglutida (200 µg/kg)       | b.i.d                    |

10

El segundo experimento incluyó 7 grupos (n = 7) de ratones DIO que recibieron una dosificación durante 2 días, de la siguiente manera:

15

| Grupo | Tratamiento (SC)                   | Frecuencia               |
|-------|------------------------------------|--------------------------|
| A     | PEG60-SH (947.4 mg/kg)             | Única inyección el día 1 |
| B     | PEG5-FMS-OXM 6000 nmol/kg          | Única inyección el día 1 |
| C     | PEG30-FMS-6000 nmol/kg             | Única inyección el día 1 |
| D     | PEG40-FMS-OXM 6000 nmol/kg         | Única inyección el día 1 |
| E     | PEG60-FMS-OXM 6000 nmol/kg         | Única inyección el día 1 |
| F     | Vehículo (PBS)                     | b.i.d                    |
| G     | Liraglutida (200 µg/kg bid) en PBS | b.i.d                    |

20

25

En ambos estudios, la administración de una única dosis de todas las variantes de PEG-OXM: PEG40-EMCS-OXM, PEG30-EMCS-OXM, PEG40-FMS-OXM, PEG30-FMS-OXM (Exp. #1) o PEG30 FMS-OXM, PEG40-FMS-OXM y PEG60-FMS-OXM (Exp. #2) produjeron 5 reducciones notorias y significativas de la glucosa en ayuno cuando se comparó con el vehículo (figuras 11 y 12). En el experimento #1, el grupo de vehículo (PEG40-SH) muestra nivel de glucosa de 9,5 mM, mientras que los grupos tratados con PEG-OXM muestran un nivel de glucosa de 5,18 a 10 5,8 mM. También se obtuvo la misma reducción del nivel de glucosa para el grupo tratado con PEG-OXM en el experimento #2 (salvo el grupo PEG5-OXM) que mostró una reducción de la glucosa de 11,9 mM de grupo de vehículo a 5-5,7 mM de grupos tratados con PEG-OXM. Este efecto se asoció a la 15 reducción en los niveles de insulina en plasma en ayuno en el experimento #1 de 2,8 ng/ml de grupo de vehículo a 1,4-1,9 ng/ml de grupos tratados con PEG-OXM, como se muestra en la Figura 11. En el experimento #2, el nivel de insulina en ayuno fue de 0,99 ng/ml, mientras que el nivel de 20 insulina en ayuno de PEG-OXM (salvo PEG5-OXM) fue de 0,78 a 0,91 ng/ml.

Liraglutida en ambos experimentos redujo significativamente la glucosa en ayuno en comparación con el vehículo (PBS); 25 9,3 mM de vehículo disminuyó a 6,06 mM en el experimento #1 y 11,5 mM de vehículo disminuyó a 6,7 mM en el experimento.

#2. Junto con esta reducción de la glucosa, este grupo tratado mostró un aumento significativo en la insulina en plasma de 2,5 ng/ml de vehículo a 4,4 ng/ml en el experimento #1 y de 1,98 ng/ml a 3 ng/ml en el experimento  
5 #2. Se analizó el péptido de OXM natural en el experimento #1 y no mostró ninguna diferencia significativa en los niveles de glucosa e insulina, en comparación con el vehículo, probablemente debido a su corta semivida en suero y muy rápida eliminación del cuerpo.

10

Los resultados de estos dos experimentos independientes en ratones DIO revelan que los compuestos de PEG-OXM inducen una reducción significativa del nivel de glucosa sin aumentar el nivel de insulina como se observó luego de la  
15 administración de Liraglutida y como es esperable a partir de los datos anteriores que se mostraron para el péptido de OXM natural. Esta reducción inesperada del nivel de glucosa junto con la reducción de los niveles de insulina en ayunas indica que una única dosis de PEG-OXM conlleva el aumento  
20 de la sensibilidad de los animales a la insulina luego de la exposición aguda y no debido al tratamiento crónico.

Mientras que ciertas características de la invención fueron ilustradas y descritas en la presente, muchas  
25 modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes se les ocurrirán a los expertos en la técnica. Debe

entenderse, por lo tanto, que se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas dichas modificaciones y cambios, los cuales se encuentran dentro del verdadero espíritu de la invención.

5

## REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Una composición que consiste en oxintomodulina, un  
5 polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) y  
9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).
2. La composición de la reivindicación 1, donde dicho  
10 polímero de PEG está unido al extremo amino o residuo de  
lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.
3. La composición de la reivindicación 1, donde dicha  
oxintomodulina consiste en la secuencia de aminoácidos  
15 establecida en la SEQ ID N°: 1.
4. La composición de la reivindicación 1, donde dicho  
polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto  
sulfhidrilo.  
20
5. La composición de la reivindicación 1, donde dicho  
polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.
6. Una composición farmacéutica que comprende la  
25 composición de la reivindicación 1 y un portador  
farmacéuticamente aceptable.

7. Un método para extender la semivida biológica de oxintomodulina, que consiste en el paso de conjugar oxintomodulina, un polímero de polietilenglicol (polímero  
5 de PEG) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS) en una relación molar de alrededor de 1:1:0,5 a alrededor de 1:1:3,5.

8. El método de la reivindicación 7, donde dicha  
10 oxintomodulina consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

9. El método de la reivindicación 7, donde dicho polímero de PEG está conjugado con el extremo amino o residuo de  
15 lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.

10. El método de la reivindicación 7, donde dicho polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto sulfhidrilo.

20 11. El método de la reivindicación 7, donde dicho polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.

12. Un método para inducir la tolerancia a la glucosa, control glicémico o ambos en un sujeto que lo necesita, que  
25 comprende el paso de administrarle a dicho sujeto una

cantidad eficaz de la composición de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

13. El método de la reivindicación 12, donde dicha  
5 oxintomodulina consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

14. El método de la reivindicación 12, donde dicho  
polímero de PEG está conjugado con el extremo amino o  
10 residuo de lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.

15. El método de la reivindicación 12, donde dicho  
polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto  
15 sulfhidrilo.

16. El método de la reivindicación 12, donde dicho  
polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.

20 17. Un método para mejorar el área bajo la curva (AUC) de oxintomodulina, que consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de dicha oxintomodulina mediante  
9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
25 fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

18. El método de la reivindicación 17, donde dicha oxintomodulina consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.
- 5 19. El método de la reivindicación 17, donde dicho polímero de PEG está conjugado con el extremo amino o residuo de lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.
- 10 20. El método de la reivindicación 17, donde dicho polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto sulfhidrilo.
- 15 21. El método de la reivindicación 17, donde dicho polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.
- 20 22. Un método para reducir la frecuencia de dosificación de oxintomodulina, que consiste en el paso de conjugar un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) con el extremo amino de dicha oxintomodulina mediante 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).
- 25 23. El método de la reivindicación 22, donde dicha oxintomodulina consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

24. El método de la reivindicación 22, donde dicho polímero de PEG está conjugado con el extremo amino o residuo de lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o  
5 FMS.

25. El método de la reivindicación 22, donde dicho polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto sulfhidrilo.

10

26. El método de la reivindicación 22, donde dicho polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.

27. Un método para reducir la ingesta de alimento, reducir  
15 el peso corporal o ambos en un sujeto, que comprende el paso de administrarle oxintomodulina conjugada con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador flexible a dicho sujeto, donde dicho enlazador flexible es 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-  
20 fluorenilmetoxicarbonilo (FMS).

28. El método de la reivindicación 27, donde dicha oxintomodulina consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

25

29. El método de la reivindicación 27, donde dicho polímero de PEG está conjugado con el extremo amino o residuo de lisina de dicha oxintomodulina mediante Fmoc o FMS.

5

30. El método de la reivindicación 27, donde dicho polímero de PEG es un polímero de PEG con un resto sulfhidrilo.

10 31. El método de la reivindicación 27, donde dicho polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.

32. Un método para aumentar la sensibilidad a la insulina en un sujeto, que comprende el paso de administrarle al  
15 sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende oxintomodulina conjugada con un polímero de polietilenglicol (polímero de PEG).

33. El método de la reivindicación 32, donde dicho  
20 polímero de PEG es PEG<sub>30</sub>, PEG<sub>40</sub> o PEG<sub>60</sub>.

34. El método de la reivindicación 32, donde dicha oxintomodulina se conjuga con dicho polímero de polietilenglicol (polímero de PEG) mediante un enlazador.

25

35. El método de la reivindicación 33, donde dicho enlazador es un enlazador flexible escindible.

36. El método de la reivindicación 33, donde el enlazador  
5 es un enlazador no escindible.

37. El método de la reivindicación 35, donde dicho enlazador flexible es 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMS).

10

38. El método de la reivindicación 36, donde dicho enlazador es éster de N-(ε-maleimidocaproiloxu)succinimida (EMCS).

15 39. El método de la reivindicación 32, donde administrar dicha composición da como resultado un aumento agudo de la sensibilidad a la insulina en dicho sujeto.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen agonistas del receptor de glucagón/GLP-1  
pegilado y pegilado inverso que incluye composiciones  
5 farmacéuticas que los comprenden y métodos para su uso.

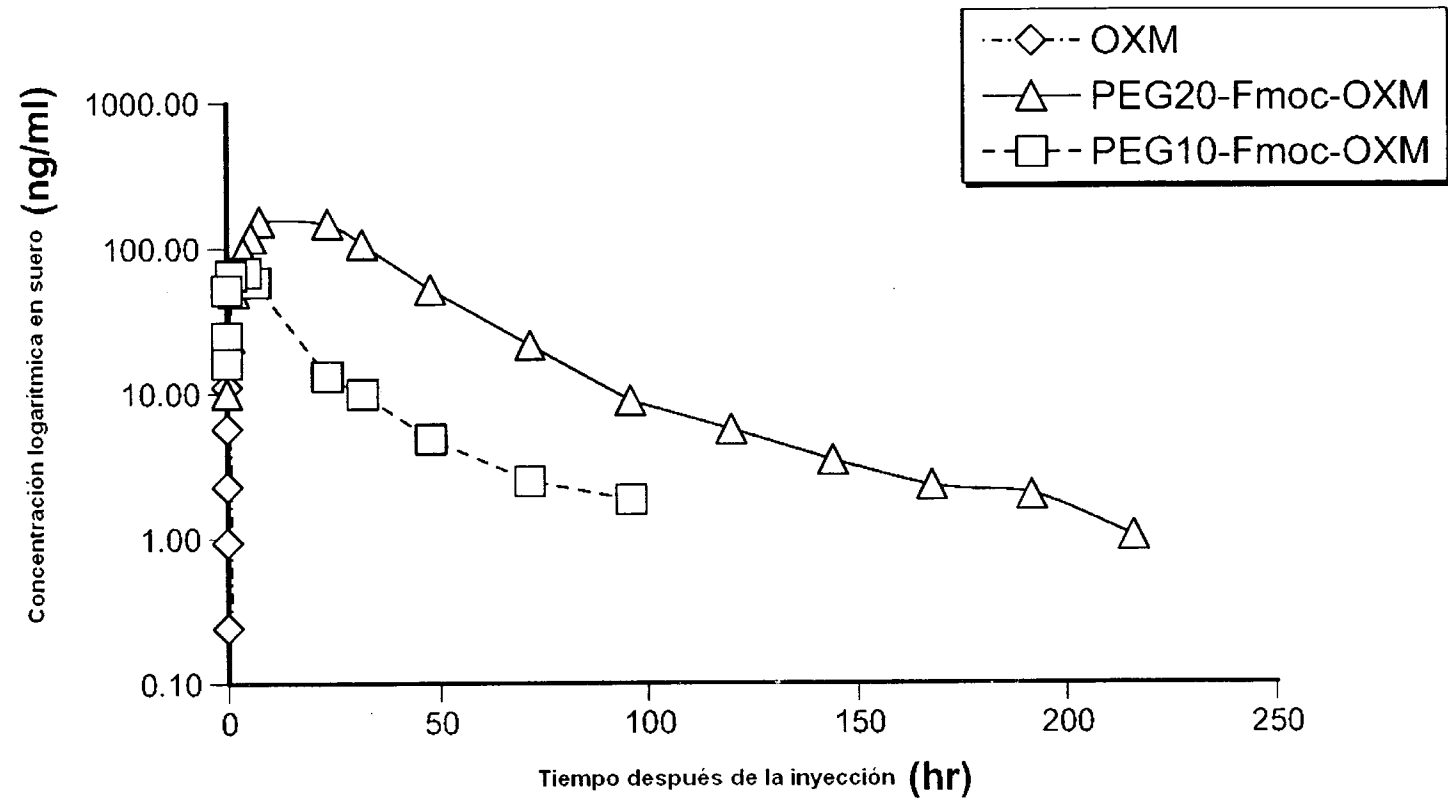


FIG. 1

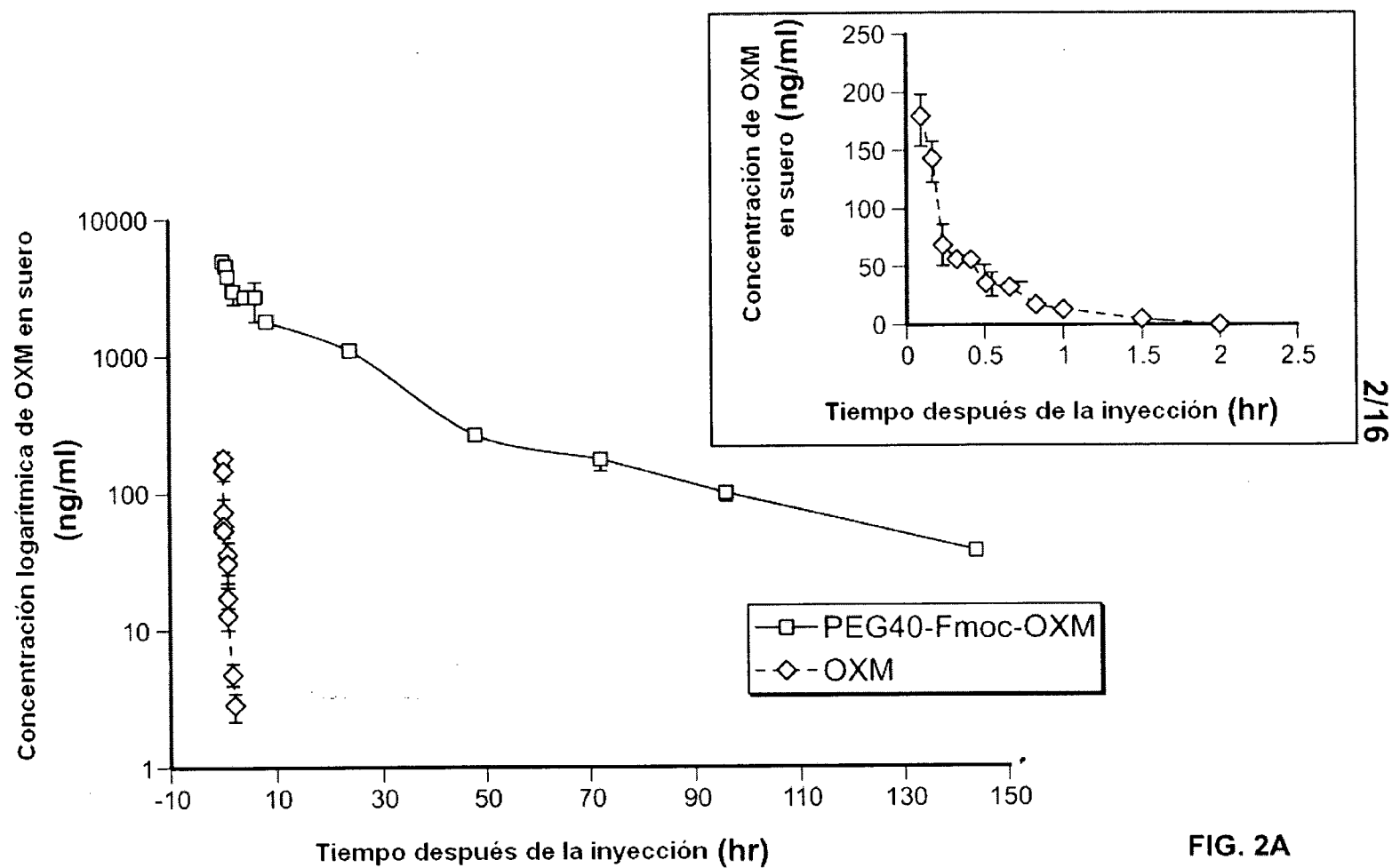


FIG. 2A

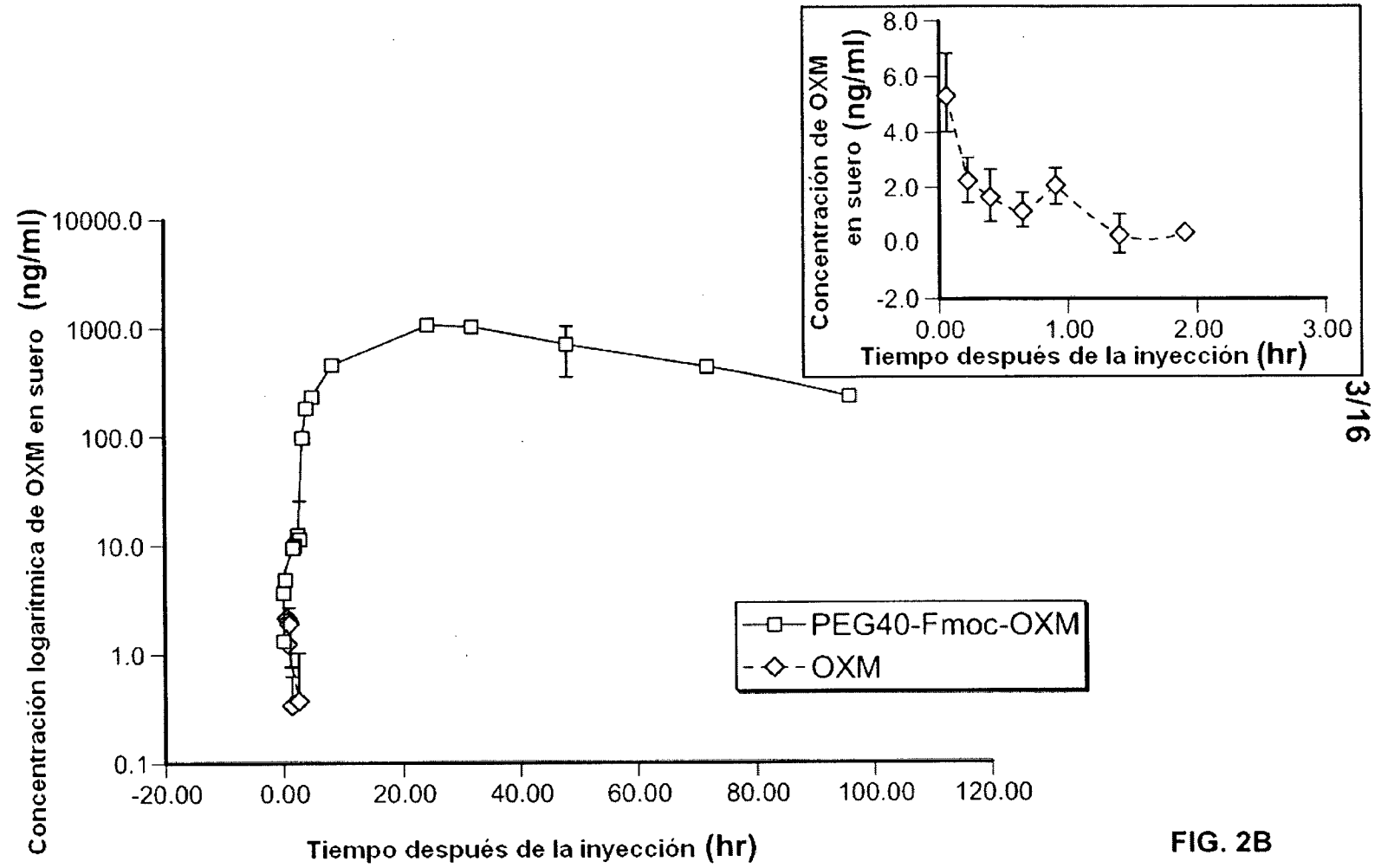


FIG. 2B

3/16

156

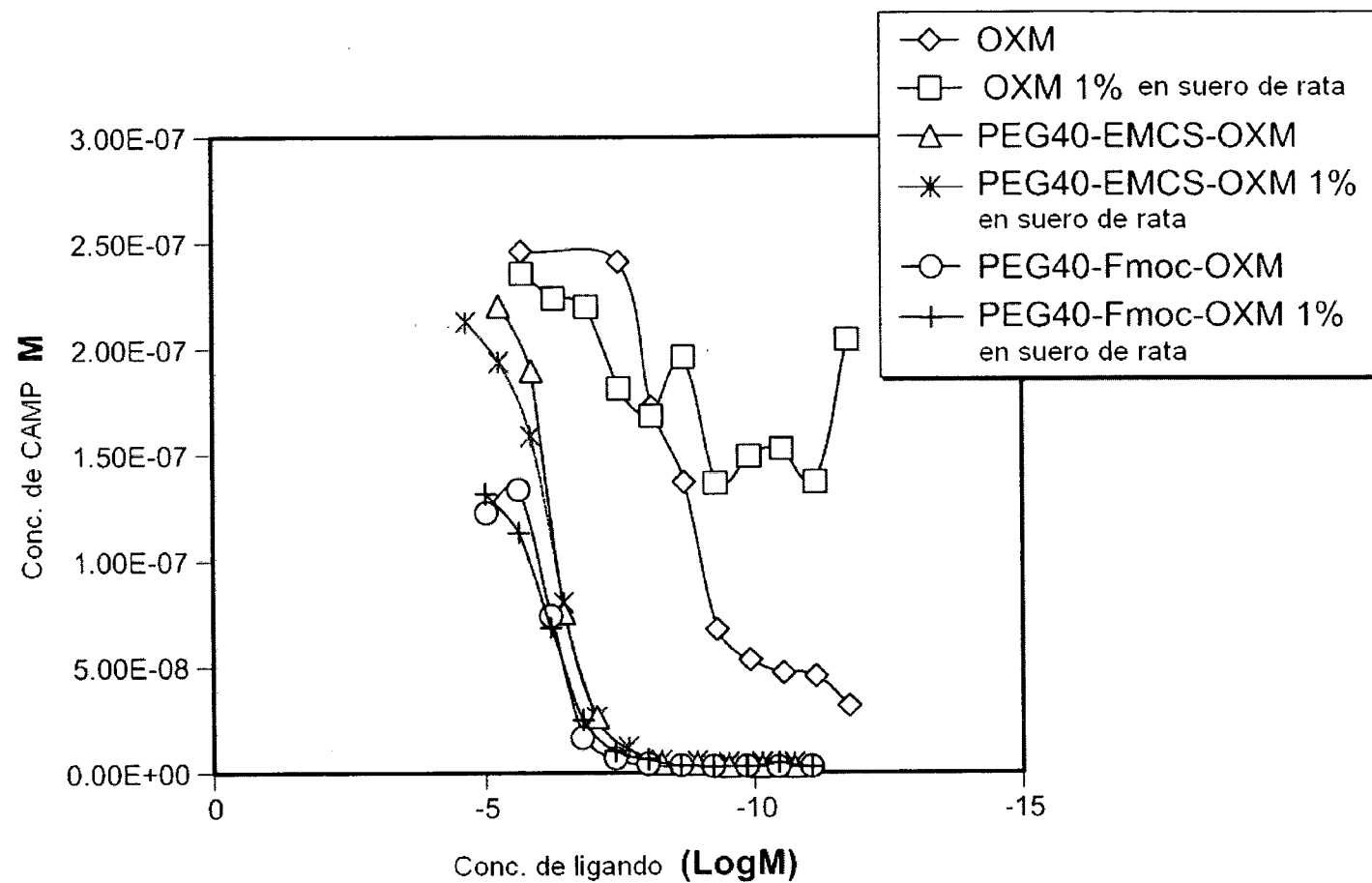


FIG. 3

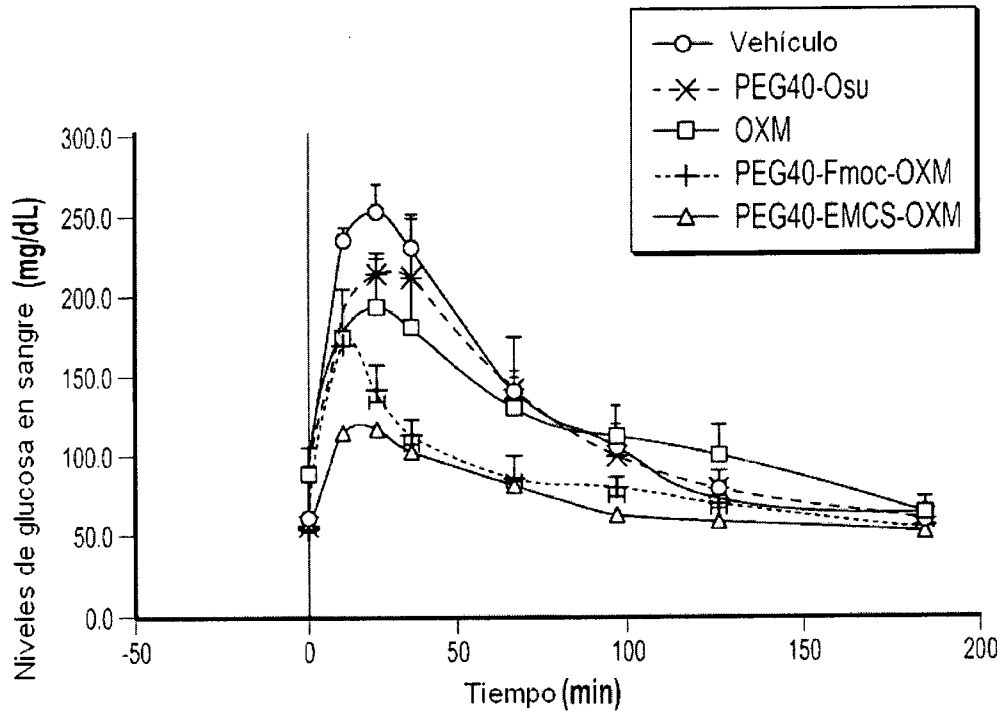


FIG. 4A

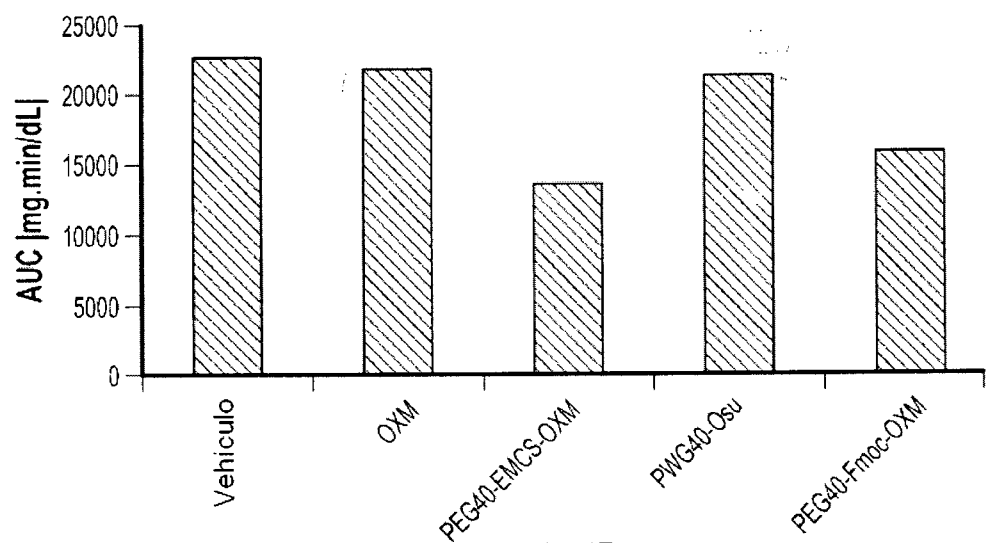


FIG. 4B

6/16

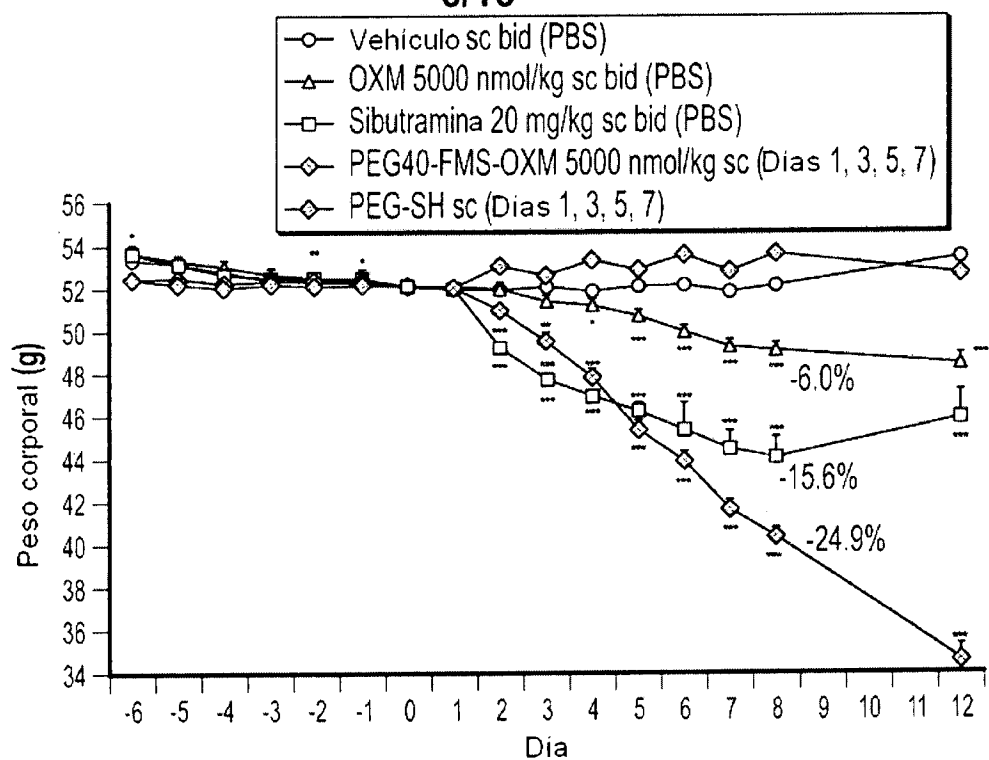


FIG. 5A

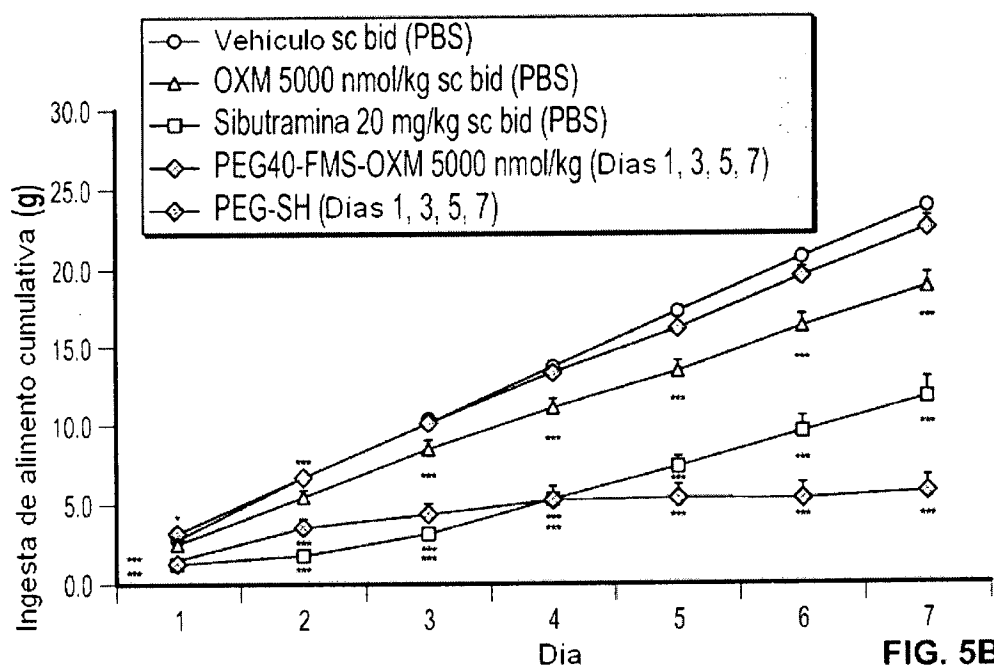


FIG. 5B

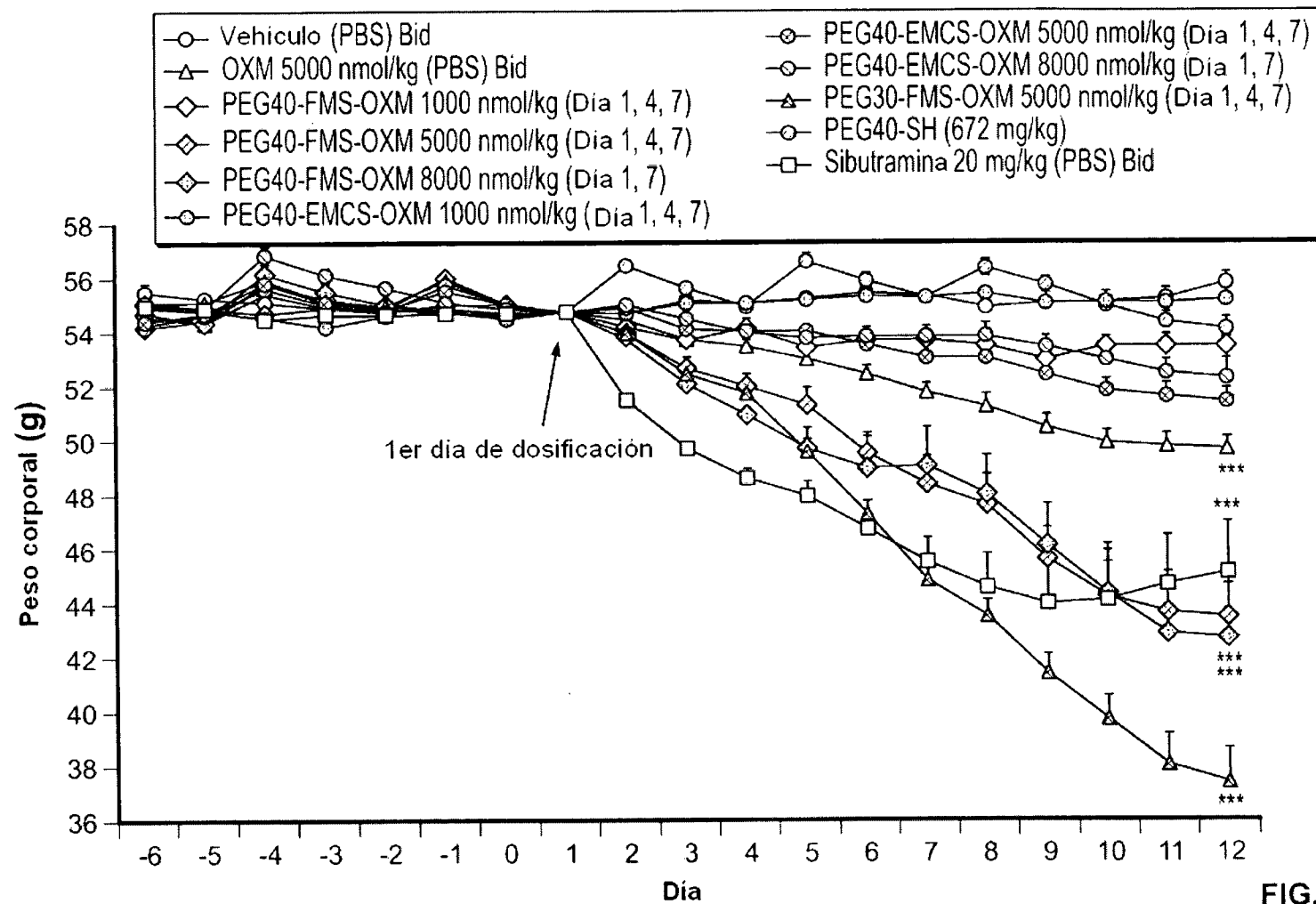
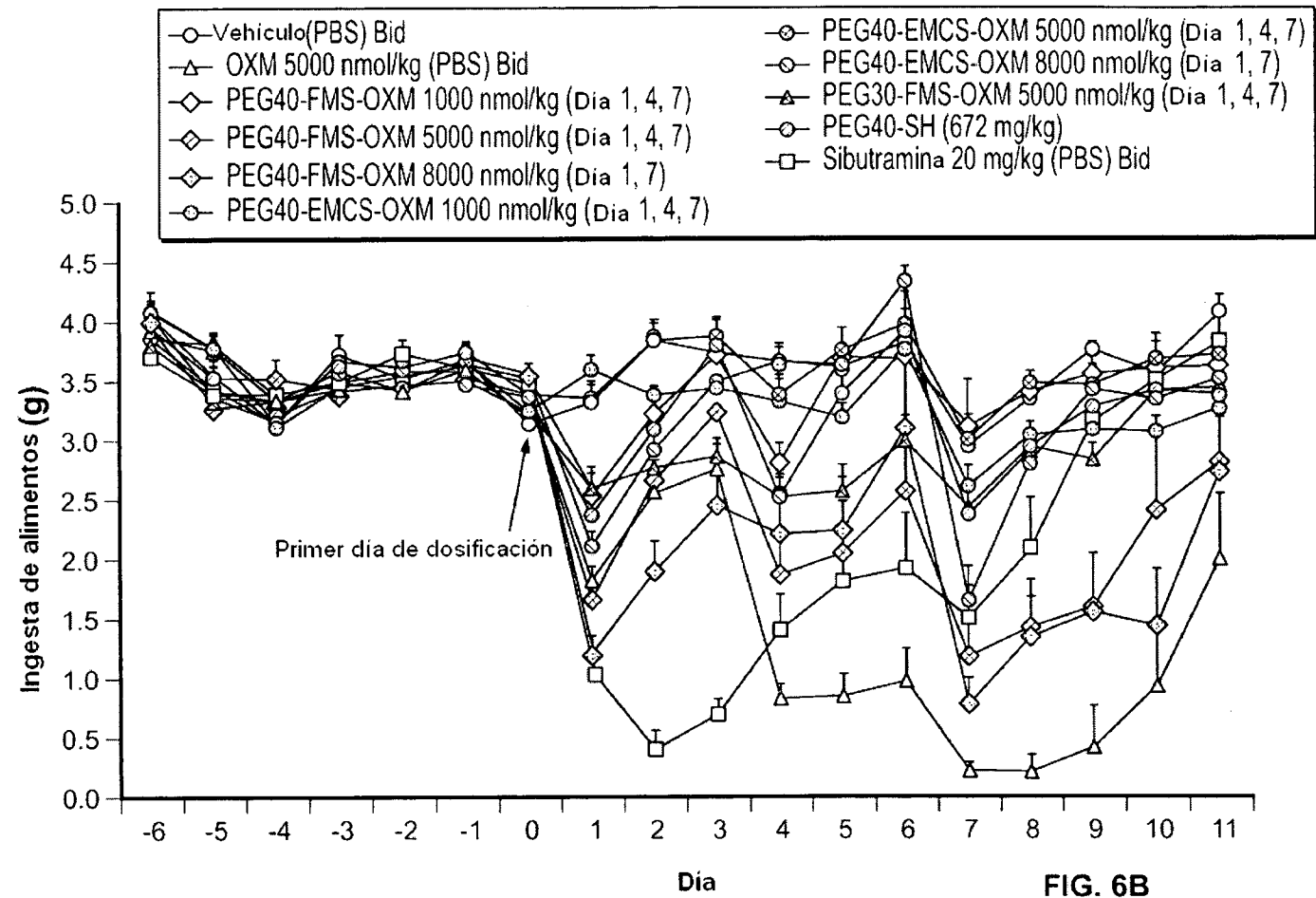
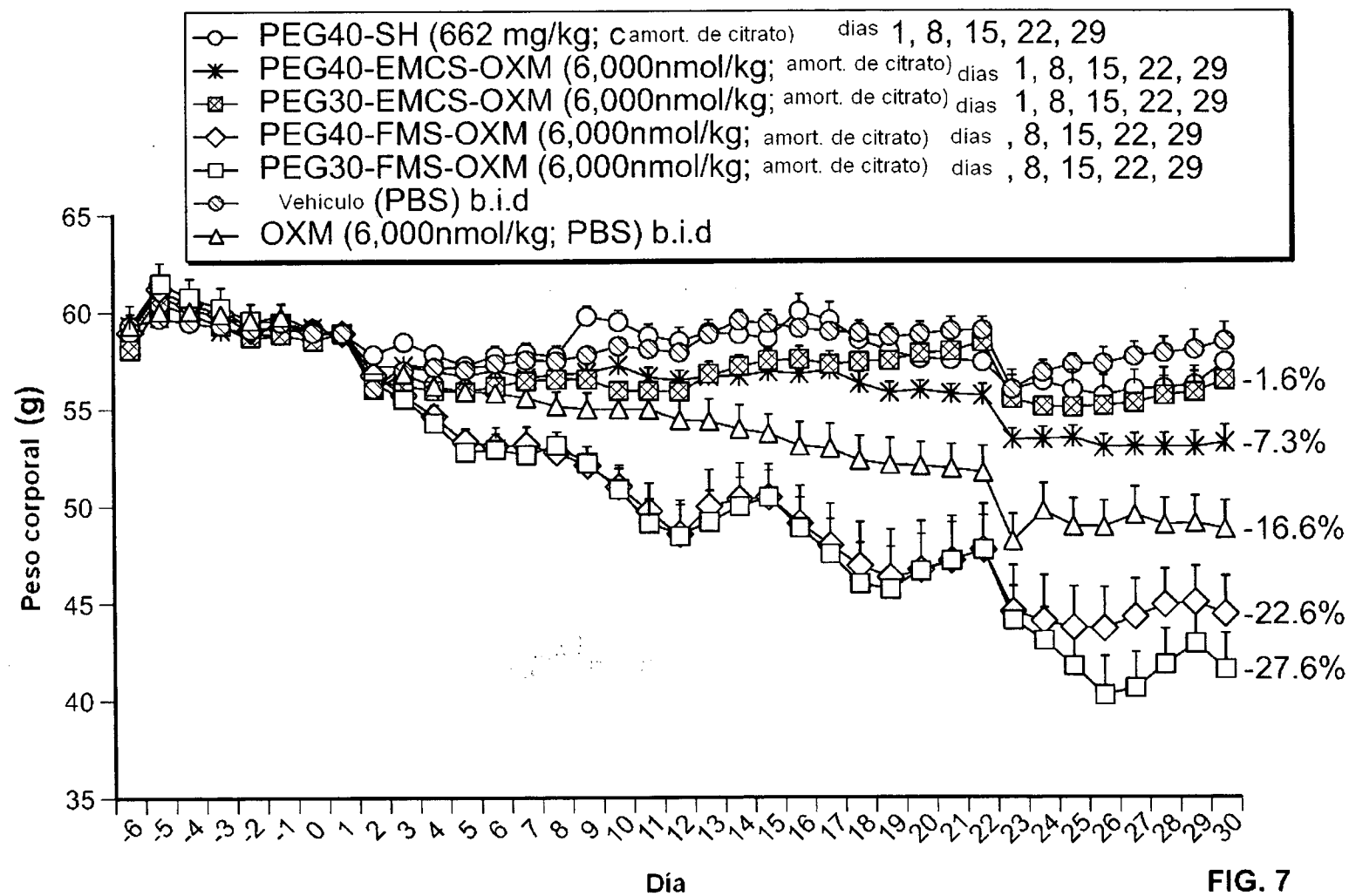
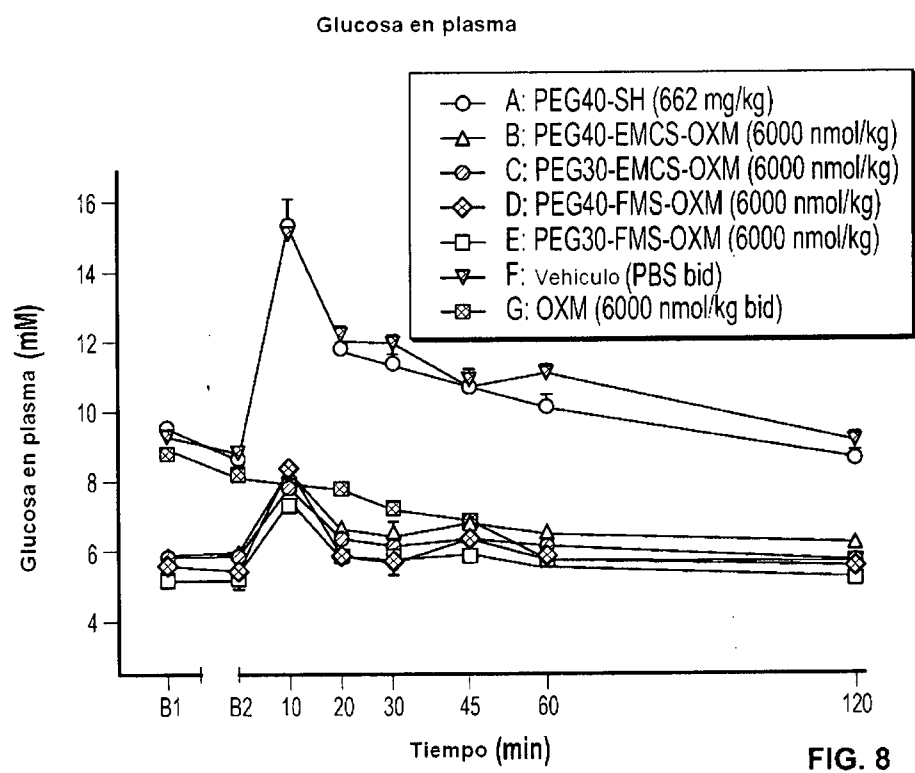


FIG. 6A







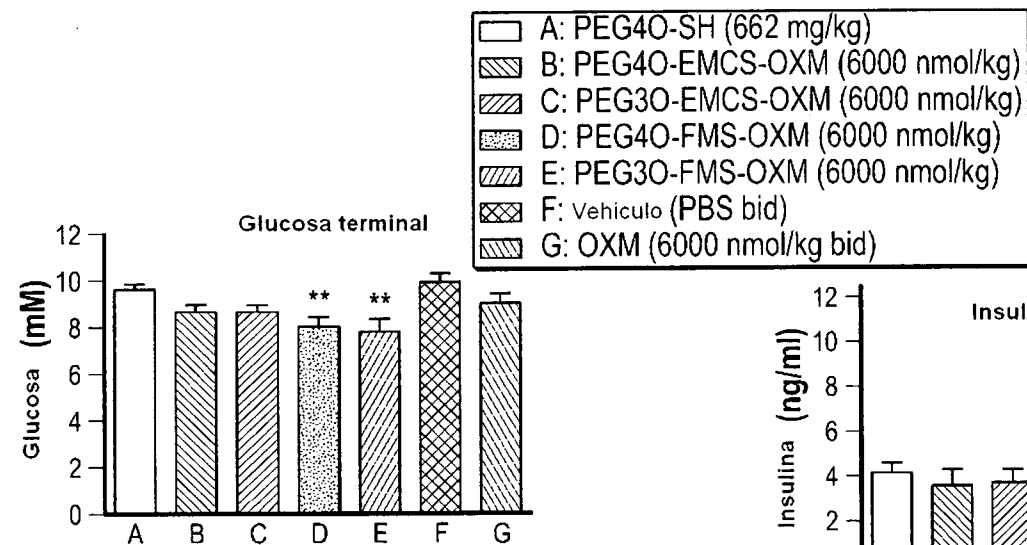


FIG. 9A

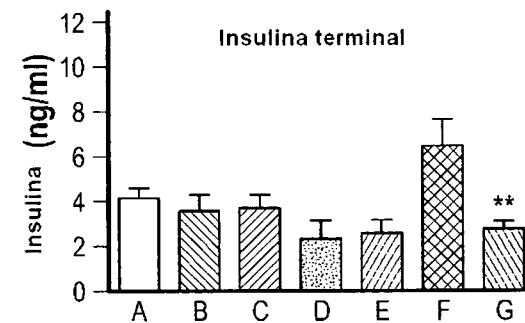


FIG. 9B

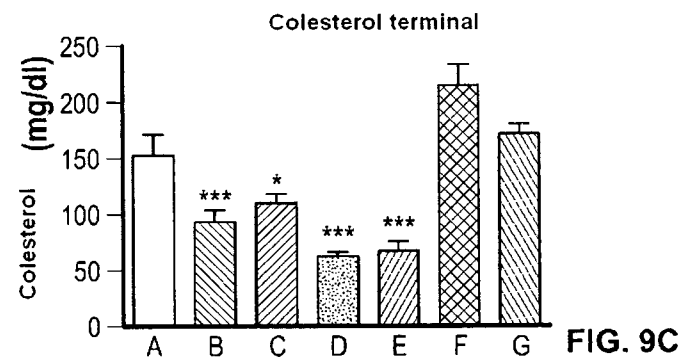


FIG. 9C

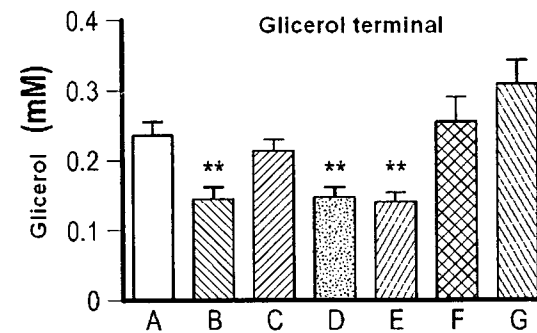


FIG. 9D

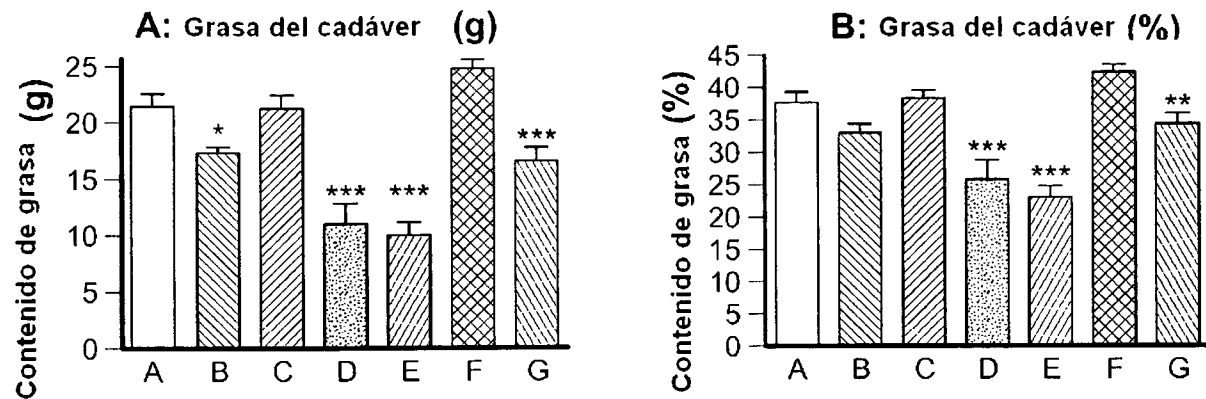


FIG. 10A

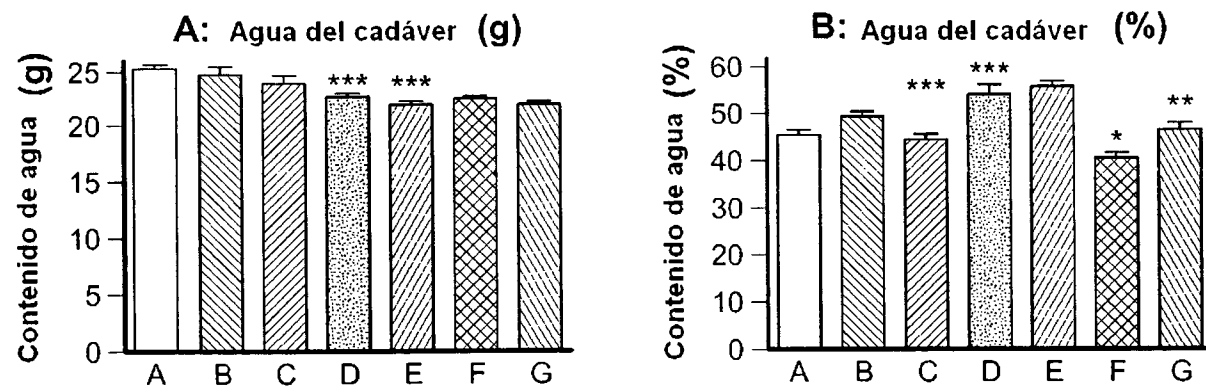


FIG. 10B

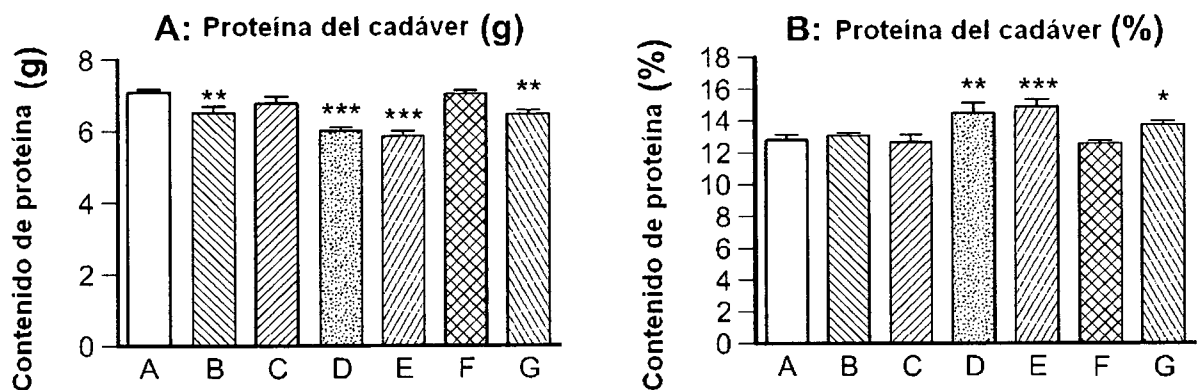


FIG. 10C

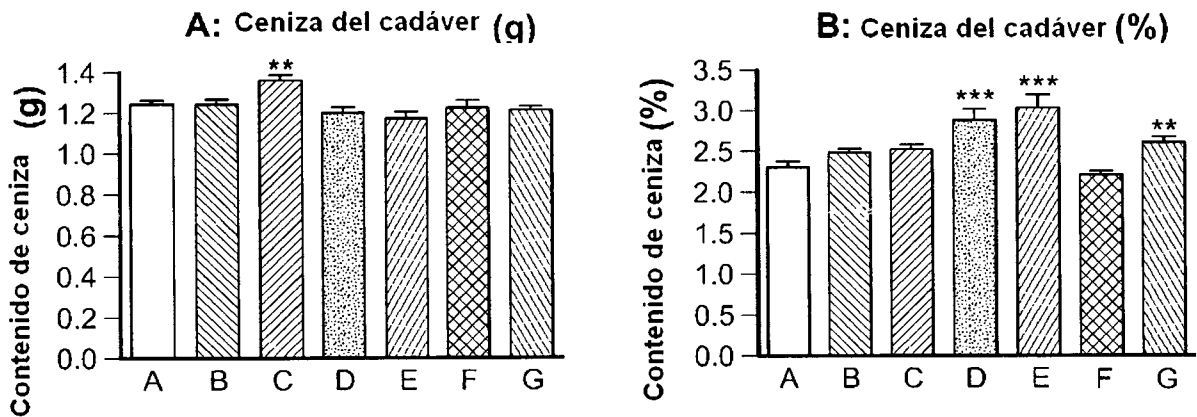


FIG. 10D

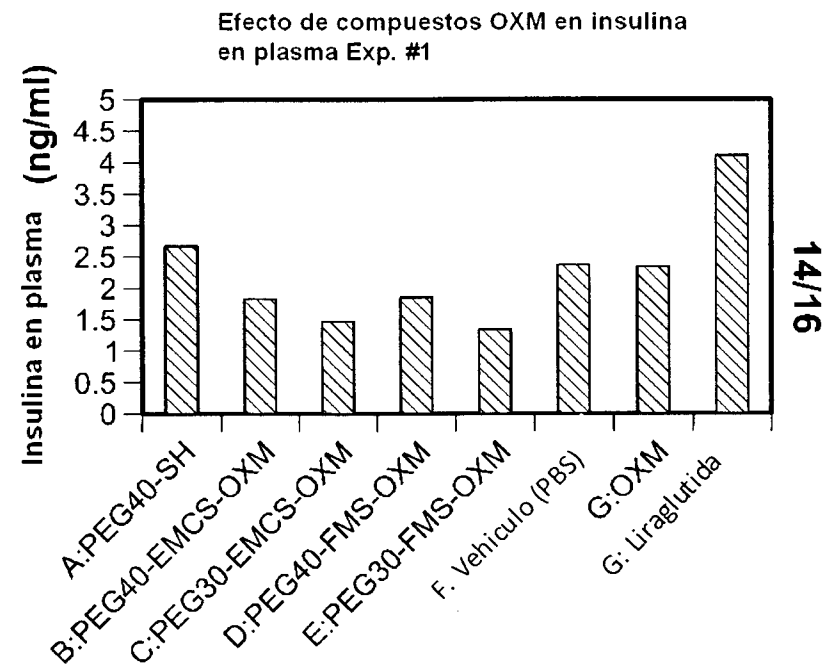
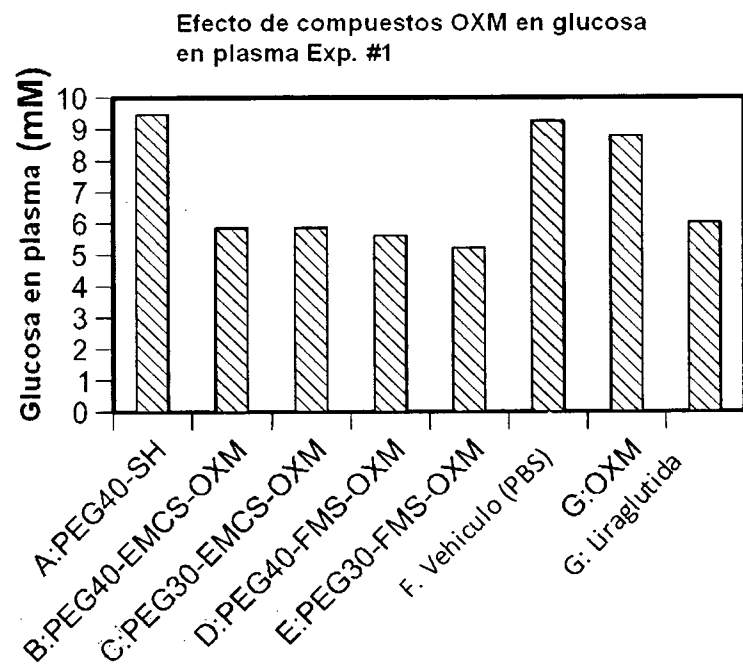
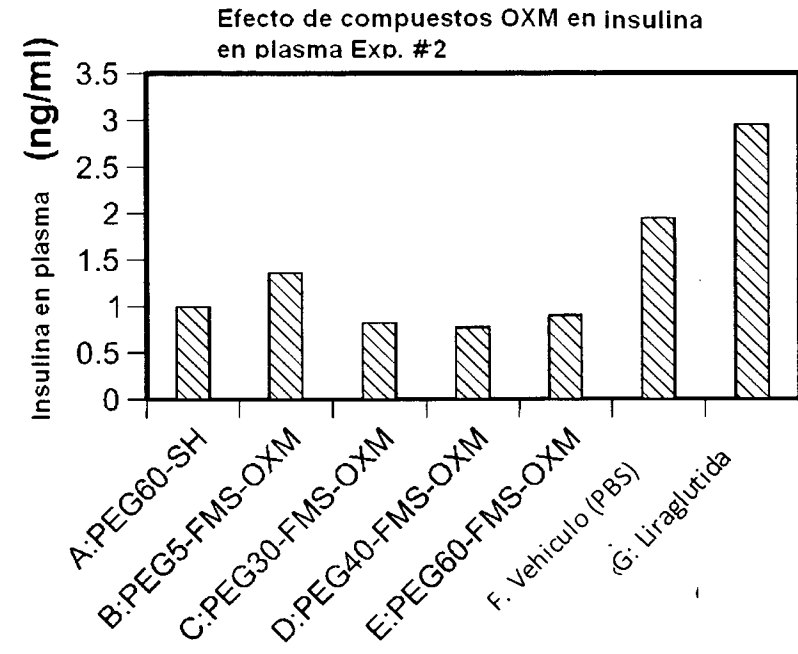
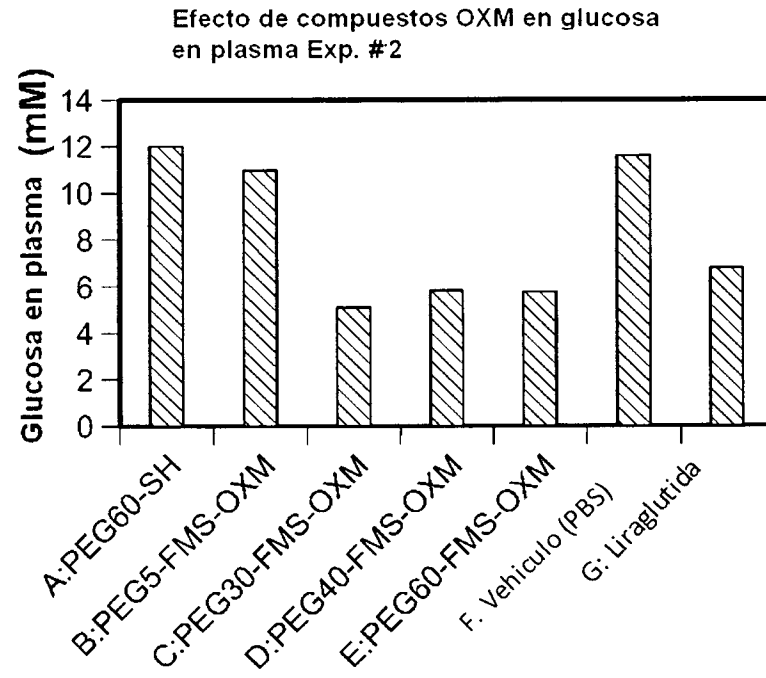


FIG. 11

Fig



15/16

FIG. 12

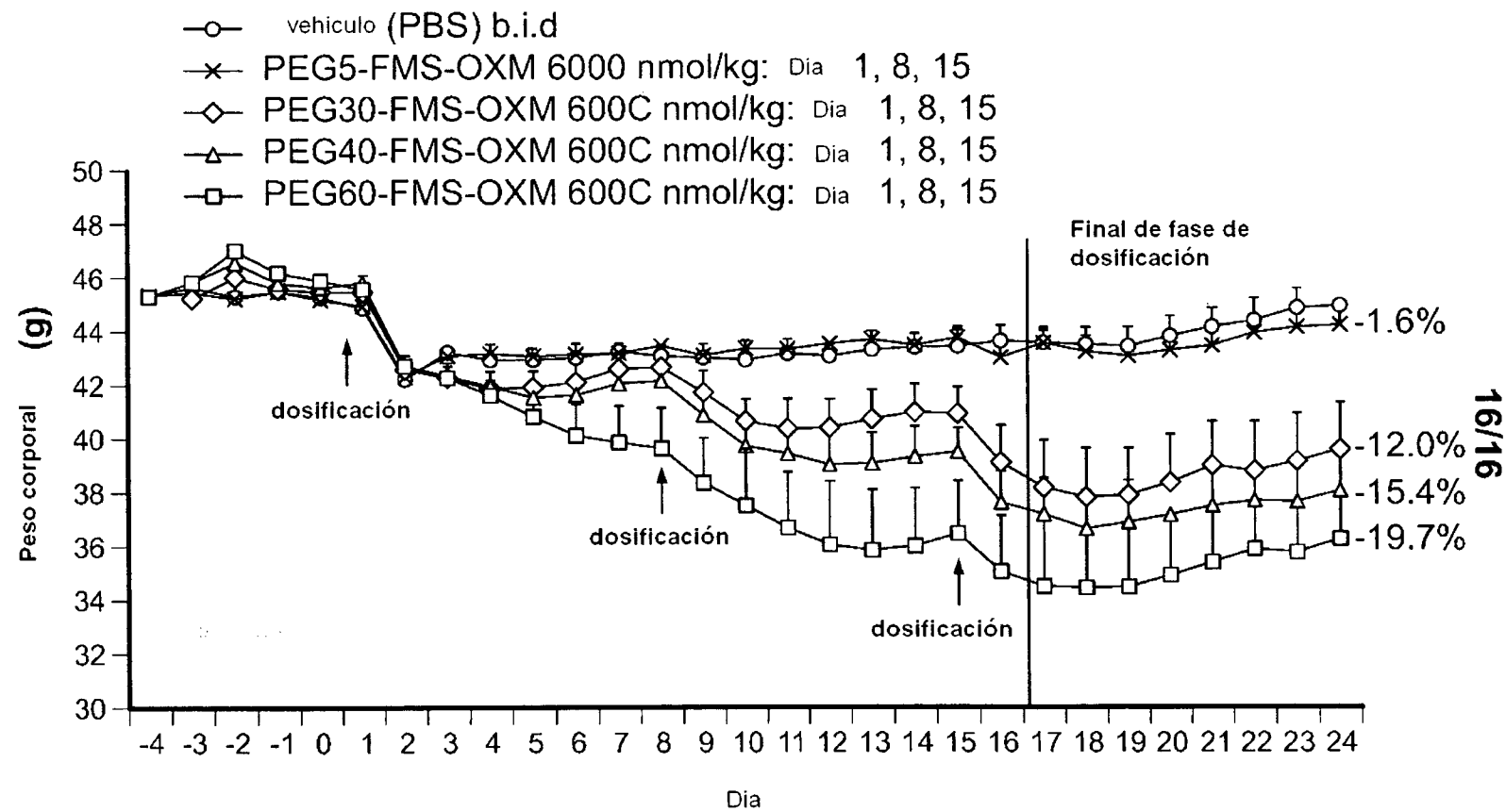


FIG. 13

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Prolor Biotech Ltd.

<120> AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1 DE ACCIÓN PROLONGADA

<130> P-74757-PC

<140> PCT/US12/999999

<141> 2012-06-04

<150> 61/492,448

<151> 2011-06-02

<150> 61/624,589

<151> 2012-04-16

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 37

<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 Lys Arg Asn

20            25            30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(10) International Publication Number

WO 2012/167251 A1

(43) International Publication Date  
6 December 2012 (06.12.2012)

(51) International Patent Classification:

A61K 38/26 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
C07K 14/605 (2006.01) A61P 7/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/040744

(22) International Filing Date:

4 June 2012 (04.06.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/492,448 2 June 2011 (02.06.2011) US  
61/624,589 16 April 2012 (16.04.2012) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PROL-  
OR BIOTECH INC. [US/US]; 7 Golda Meyer Street,  
Weizmann Science Park, 74140 Nes Ziona (IL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FIMA, Udi, Eyal  
[IL/IL]; 30 Albek St., 84833 Beer-Sheva (IL). HER-  
SHKOVITZ, Oren [IL/IL]; 10/17 Rupin Street, 75256  
Rishon Lezion (IL).

(74) Agents: COHEN, Mark, S. et al.; PEARL COHEN  
ZEDEK LATZER LLP, 1500 Broadway, 12th Floor, New  
York, NY 10036 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,  
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments (Rule 48.2(h))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: LONG-ACTING GLP-1/GLUCAGON RECEPTOR AGONISTS

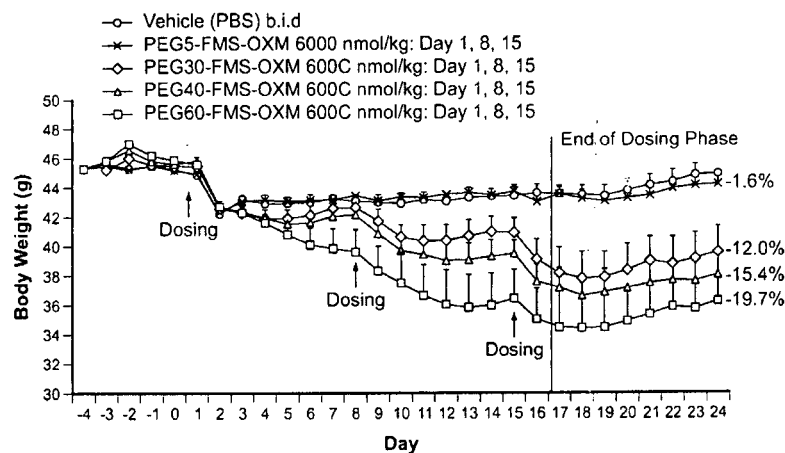


FIG. 13

(57) Abstract: Pegylated and reverse pegylated GLP-1/Glucagon receptor agonists including pharmaceutical compositions comprising the same and methods of using the same are disclosed.

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

No. 13 - 129173

Bogotá D.C., Diciembre 13 de 2013 - 08:34:28

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 569012813 | 12/12/2013 | 13.250.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 500.000.00   | 500.000.00   |
|       |                         |                                            |              | \$500.000.00 |
|       |                         |                                            | =====        |              |

SON: \*\*QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

-\*\*\*-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301132- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:45:32

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 174

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 13 de 2013 - 08:34:30

173

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

- / -



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 13 - 135370**

Bogotá D.C., Diciembre 27 de 2013 - 13:34:56

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR PAGO    |
|--------------|-----------|--------|------------|------------|------------|
| RECIBO DE CA | 999999999 | 135367 | 27/12/2013 |            | 840.000.00 |
| RECIBO DE CA | 999999999 | 135368 | 27/12/2013 |            | 120.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. RENTISTICO           | CONCEPTO                                                        | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|
| 29 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA<br>ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00    | 870.000.00          |
|                            |                                                                 |              | <u>\$870.000.00</u> |

=====

**MON: \*\*OCHOCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 13-301132- -00000-0000**

Fecha: 2013-12-27 13:45:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 174

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.slc.gov.co](http://www.slc.gov.co) e-mail: [info@slc.gov.co](mailto:info@slc.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 27 de 2013 - 13:34:56

178



No. 13-301132-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:45:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 174

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

☐  
☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño.

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
CONSULTA DE DOCUMENTOS**

**PAGINA SIN DIGITALIZAR**