



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 852**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06759598 .3**  
96 Fecha de presentación : **11.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1881850**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2008**

54 Título: **Compuestos GLP-1 pegilados.**

30 Prioridad: **13.05.2005 US 680688 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.01.2011**

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**  
**Lilly Corporate Center**  
**Indianapolis, Indiana 46285, US**

72 Inventor/es: **Millican, Rohn, Lee, Jr.;**  
**Zhang, Lianshan;**  
**Mayer, John, Philip;**  
**Vick, Andrew, Mark y**  
**Glaesner, Wolfgang**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 350 852 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Descripción****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a compuestos del péptido-1 del tipo de glucagón (GLP-1) modificados con polietilenglicol (PEG) y compuestos relacionados que son útiles en el tratamiento de afecciones o trastornos que se benefician rebajando la glucosa en sangre, disminuyendo la ingestión de alimentos, disminuyendo el vaciado gástrico o intestinal, aumentando el número y/o la función de células beta ( $\beta$ ) y/o la función y/o inhibiendo la apoptosis de las células  $\beta$ , o rebajando la motilidad gástrica o intestinal.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El GLP-1 induce numerosos efectos biológicos tales como la estimulación de la secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, la inhibición del vaciado gástrico, la inhibición de la motilidad gástrica o la motilidad intestinal, la intensificación de la utilización de glucosa y la inducción de pérdida de peso. Además, el GLP-1 puede actuar para prevenir el deterioro de las células  $\beta$  pancreáticas que se produce a medida que progresa la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). Una característica significativa de GLP-1 es su capacidad de estimular la secreción de insulina sin el riesgo asociado de hipoglucemia. GLP-1 induce la secreción de insulina sólo cuando los niveles de glucosa se elevan, a diferencia de otras terapias que actúan aumentando la expresión de insulina sin considerar si los niveles de glucosa son elevados.

La utilidad de la terapia implicando péptidos GLP-1 ha sido limitada debido a que GLP-1(1-37) es poco activo y los dos péptidos truncados naturales, GLP-1 (7-37)OH y GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, se aclaran rápidamente in vivo y tienen semividas extremadamente cortas in vivo. Se sabe que la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) producida endógenamente inactiva péptidos GLP-1 circulantes eliminando los restos de histidina N-terminal y alanina y es causa principal de la corta semivida in vivo.

Si bien varios enfoques han dado por resultado compuestos GLP-1 con una más larga semivida o mayor potencia que la de GLP-1 nativo, se necesitan más compuestos para disminuir más el aclaramiento y aumentar la semivida, optimizando así la capacidad de GLP-1 de ser útil como agente terapéutico que se puede administrar un número mínimo de veces durante un prolongado período de tiempo. Las solicitudes de patente internacional n<sup>os</sup>. PCT/US2004/006082 y PCT/CTS2000/11814 describen una unión covalente de una o varias moléculas de PEG a varios PLG-1 y compuestos de exendina. Estos compuestos pueden tener una semivida de más de 24 horas, lo que permite menos administraciones del compuesto GLP-

1 PEGilado mientras que se mantiene un nivel alto en sangre del compuesto durante un prolongado período de tiempo.

Más investigación ha dilucidado un problema que es que durante un almacenamiento prolongado en envase se produce la separación de PEG de un GLP-1 PEGilado o exendina.

5 Como resultado, el péptido GLP-1 o exendina aumenta el perfil de exposición de la concentración pico inicial a través de la ventana terapéutica. Esto tiene la posibilidad de aumentar los efectos secundarios de náusea y vómitos.

La presente invención busca eludir los problemas asociados con un almacenamiento prolongado en envase y la potencial separación de PEG de GLP-1 PEGilado o compuesto de exendina introduciendo dos sitios de PEGilación en un compuesto GLP-1 o exendina y PEGilando luego esos dos sitios de PEGilación simultáneamente. Las ventajas de este enfoque son como mínimo cuádruples. Primeramente, la PEGilación de los compuestos mejorará espectacularmente las semividas in vivo de los compuestos. Segundo, la PEGilación de los compuestos ralentizará la velocidad de absorción del compuesto y reducirá por ello la disgregación inicial del fármaco que se cree es responsable de los efectos secundarios. Tercero, se pueden usar PEG lineales directamente para la PEGilación y ello simplificará el procedimiento de síntesis. Cuarto una PEGilación emparejada aliviará los acontecimientos asociados con un almacenamiento en envase prolongado y la posibilidad de separación de PEG del compuesto PGL-1 PEGilado o de exendina por disminuir la probabilidad de que ambos PEG se separen de la misma molécula de péptido GLP-1 o exendina.

Además, la introducción de dos sitios de PEGilación en el compuesto GLP-1 o de exendina en el extremo C-terminal del compuesto y luego la PEGilación de esos dos sitios de PEGilación simultáneamente da compuestos PEGilados que tienen mayor actividad que los compuestos PEGilados en los que al menos uno de los sitios de PEGilación no está en el extremo C-terminal del péptido. Además, la unión de un conector que comprende dos sitios de PEGilación en el extremo C-terminal de un compuesto GLP-1 y la posterior PEGilación simultánea de esos dos sitios de PEGilación da por resultado compuestos GLP-1 PEGilados que tienen una actividad mayor que la de los compuestos PEGilados en los que los sitios de PEGilación están unidos al extremo C-terminal de un compuesto GLP-1 sin conector.

30 Tales compuestos GLP-1-PEGilados se pueden usar terapéuticamente para tratar sujetos con trastornos, incluidos diabetes, obesidad, anormalidades en la motilidad gástrica y/o intestinal, deficiencia de células (por ejemplo, células  $\beta$  insuficientes o que no funcionan) y anormalidades en el vaciado gástrico y/o intestinal, siendo una ventaja el que los compuestos GLP-1 PEGilados de la invención requieren dosis menores durante un período de 24 horas,

aumentando así la conveniencia para un sujeto que necesita tal terapia y la probabilidad de que el sujeto acepte los requerimientos de la dosificación.

### SUMARIO DE LA INVENCION

5 La invención descrita en esta memoria proporciona compuestos GLP-1 unidos covalentemente a dos moléculas de polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo en el que cada PEG está unido a un resto de cisteína, dando ello por resultado compuestos GLP-1 PEGilados con una semivida de eliminación de como mínimo una hora o, de como mínimo 3, 10 5, 7, 10, 15, 20 horas, o de como mínimo 24 horas. Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen un valor de aclaramiento de 200 ml/h/kg o menos, o 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos, o menos de 50, 40 o 20 ml/h/kg.

Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de la fórmula

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Gln-  
Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-  
15 Pro-Pro-Pro-Cys<sub>45</sub>- Xaa<sub>46</sub>                      **Fórmula I (SEC. ID. NO: 1)****

en la que Xaa<sub>8</sub> es: D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa<sub>22</sub> es: Gly, Glu, Asp o Lys;

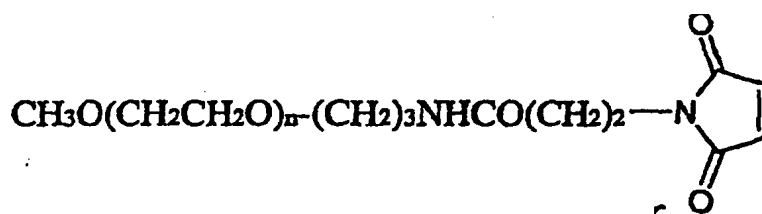
Xaa<sub>33</sub> es: Val o Ile;

20 Xaa<sub>46</sub> es: Cys o Cys-NH<sub>2</sub>;

y en los que una molécula de PEG está unida covalentemente a Cys<sub>45</sub> y una molécula de PEG está unida covalentemente a Cys<sub>46</sub> o Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, para los compuestos GLP-1 PEGilados de Fórmula I: Xaa<sub>8</sub> es Gly o Val; Xaa<sub>22</sub> es Gly o Glu; Xaa<sub>33</sub> es Val o ile, y Xaa<sub>46</sub> es Cys o Cys-NH<sub>2</sub>. Son también preferibles  
25 los compuestos GLP-1 PEGilados de Fórmula I en los que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Val o Ile, y Xaa<sub>46</sub> es Cys o Cys-NH<sub>2</sub>. También son preferibles los compuestos GLP-1 PEGilados de Fórmula I en los que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Val y Xaa<sub>46</sub> es Cys. También son preferibles los compuestos GLP-1 PEGilados de Fórmula I en los que Xaa<sub>8</sub> es Val, Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Val y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>. También son preferibles los compuestos PGL-1  
30 PEGilados de Fórmula I en los que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys. También son preferibles los compuestos PGL-1 PEGilados de Fórmula I en los que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>.

Los polímeros polietilenglicol ("PEG") usados en la invención tienen pesos moleculares entre 500 y 100.000 daltons, o entre 5.000 y 40.000 daltons, o entre 20.000 y 60.000 daltons, o entre 20.000 y 40.000 daltons, y pueden ser moléculas lineales o ramificadas, y pueden ser derivados de polietilenglicol como los descritos en la técnica. La molécula de PEG unida covalentemente a compuestos GLP-1 en la presente invención no está limitada a un tipo particular. Preferiblemente, el PEG es una metoxi PEG maleimida lineal de 20 kilodalton. Más preferiblemente, el PEG es



La presente invención abarca compuestos para estimular el receptor de GLP-1 en un sujeto que necesita tal estimulación. Los compuestos se administran al sujeto en una cantidad eficaz de un compuesto GLP-1 PEGilado descrito aquí. Entre los sujetos que necesitan la estimulación del receptor de GLP-1 figuran los de diabetes no dependiente de insulina, hiperglucemia inducida por tensión, obesidad, trastornos de motilidad o vaciado gástrico/intestinal incluidos, por ejemplo, síndrome de intestino irritable, deficiencia de células beta ( $\beta$ ) y dispepsia funcional.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El péptido 1 del tipo de glucagón (GLP-1) es un péptido de 37 aminoácidos segregado por las células L del intestino en respuesta a la ingestión de alimento. Se han descrito en la técnica numerosos análogos y derivados de GLP-1. La presente invención describe modificaciones de compuestos GLP-1 que dan por resultado una semivida de eliminación extendida y/o un aclaramiento reducido. La incorporación de restos de cisteína en sitios particulares de amino-acidos del péptido proporciona un grupo tiol al que se puede unir covalentemente un polietilenglicol (PEG) o derivado de PEG dando por resultado un compuesto GLP-1 PEGilado.

El término "compuesto GLP-1", tal como se usa aquí, incluye GLP-1 nativo [GLP-1 (7-37)OH o GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>], análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, fragmentos de GLP-1 biológicamente activos, GLP-1 extendido o un análogo o fragmento de un péptido GLP-1 extendido, análogos de exendina-4 y derivados de exendina-4. Preferiblemente, un análogo de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-37)OH o un péptido GLP-1 extendido de

manera que 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos difieren del aminoácido en la correspondiente posición de GLP-1(7-37)OH o fragmento de GLP-1(7-37)OH o modificada de manera que 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos difieren del aminoácido en la posición correspondiente de un péptido GLP-1 extendido.

5 El término “PEGilado”, cuando se refiere a un compuesto GLP-1 de la presente invención, se refiere a un compuesto GLP-1 que está químicamente modificado por unión covalente de dos moléculas de polietilenglicol o un derivado del mismo. Además, se desea que el término “PEG” se refiera a polietilenglicol o un derivado del mismo como los conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patentes U.S. nº. 5.445.090, nº. 5.900.461, nº. 5.932.462, nº.  
10 6.436.386, nº. 6.448.369, nº. 6.437.025, nº. 6.448.369, nº. 6.495.659, nº. 6.515.100 y nº. 6.514.491). Preferiblemente, en los compuestos GLP-1 pegilados de la presente invención, el PEG (o un derivado del mismo) está covalentemente unido a dos restos de cisteína introducidos en el compuesto PLG-1. Preferiblemente, los dos restos de cisteína introducidos en el compuesto GLP-1 están en la posición 45 y 46.

15 “Actividad insulínica” se refiere a la capacidad de estimular la secreción de insulina en respuesta a niveles de glucosa elevados, causando la asimilación de glucosa por las células y unos niveles rebajados de glucosa en plasma. La actividad insulínica se puede estimar por procedimientos conocidos en la técnica, incluidos el uso de experimentos in vivo y in vitro que miden la actividad de unión del receptor de GLP-1 o la activación del receptor, por ejemplo,  
20 ensayos en los que se usan células de islotes pancreáticos o células de insulinomas, como se describe en la patente EP 619.322, expedida a Gelfand y otros, y la patente U.S. nº. 5.120.712, respectivamente. Rutinariamente la actividad insulínica en seres humanos se mide midiendo los niveles de insulina o niveles de péptido C. A los fines de la presente invención se usa un ensayo de señalización de receptor de GLP-1 in vitro para determinar si un compuesto  
25 GLP-1 PEGilado de la presente invención presentará actividad insulínica in vivo. La actividad insulínica es una actividad que se puede usar para demostrar que el compuesto PLG-1 PEGilado es biológicamente activo. Todos los compuestos GLP-1 PEGilados de la invención tienen actividad insulínica (Véase Ejemplo 6).

“Potencia in vitro”, tal como se usa aquí, es la medida de la capacidad de un péptido de  
30 activar el receptor de GLP-1 en un ensayo basado en células. La potencia in vitro se expresa como  $CE_{50}$  que es la concentración eficaz de compuesto que da por resultado una actividad del 50% en un experimento de dosis individual-respuesta. A los fines de la presente invención, la potencia in vitro se determina usando un ensayo de fluorescencia que emplea células HEK-293 que expresan establemente el receptor de GLP-1 humano. Estas células HEK-293 tienen un  
35 vector de ADN integrado establemente que tiene un elemento de AMPc (CRE) que guía la

expresión del gen de luciferasa. La interacción de un compuesto GLP-1 o un compuesto GLP-1 PEGilado con el receptor inicia una señal que da por resultado la activación del elemento de respuesta de AMPc y posterior expresión de la luciferasa. Los valores de  $CE_{50}$  para los compuestos GLP-1 PEGilados indicados en el Ejemplo 3 se determinaron usando el ensayo de luciferasa descrito antes. Los valores relativos de la potencia in vitro se pueden establecer empleando Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH o GLP-1 nativo como control y asignando al control un valor de referencia de 100%.

El término “semivida en plasma” se refiere al tiempo en el que la mitad de las moléculas relevantes circulan en el plasma antes de ser aclaradas. Un término usado alternativamente es “semivida de eliminación”. El término “extendido” o “más largo” usado en el contexto de semivida en plasma o semivida de eliminación indica que hay un aumento estadísticamente significativo de la semivida de un compuesto GLP-1 PEGilado en relación a la de la molécula de referencia (por ejemplo la forma no PEGilada del péptido o el péptido nativo) determinada en condiciones comparables. Preferiblemente, un compuesto GLP-1 PEGilado de la presente invención tiene una semivida de eliminación de como mínimo una hora, más preferiblemente de como mínimo 3, 5, 7, 10, 15, 20 horas y, muy preferiblemente, de como mínimo 24 horas. La semivida dada en los Ejemplos 4 y 5 es la semivida de eliminación; es la que corresponde a la velocidad log-lineal terminal de eliminación. Los expertos en la técnica apreciarán que la semivida es un parámetro derivado que cambia en función del aclaramiento y el volumen de distribución.

El aclaramiento es una medida de la capacidad del cuerpo de eliminar un fármaco. A medida que el aclaramiento disminuye debido a, por ejemplo, modificaciones hechas a un fármaco, sería de esperar que aumentara la semivida. Sin embargo, esta relación recíproca es sólo exacta cuando no hay cambio en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semivida log-lineal terminal ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento (A) y el volumen de distribución (V) viene dada por la ecuación  $t_{1/2} = 0,693(V/A)$ . El aclaramiento no indica cuánto fármaco se está eliminando, sino el volumen de fluido biológico o plasma que tendría que ser liberado del fármaco para lograr la eliminación. El aclaramiento se expresa como un volumen por unidad de tiempo. Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen un valor de aclaramiento de 200 ml/h/kg o menos, o 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos, o 50, 40 o 20 ml/h/kg o menos (véase Ejemplo 4 y 5).

En la presente invención, se incorpora un aminoácido Cys en las posiciones 45 y 46 de los compuestos GLP-1. La molécula resultante está PEGilada en los aminoácidos Cys dando por resultado una molécula modificada que retiene la totalidad o una porción de la actividad

biológica mientras que tiene una semivida más larga que la de la molécula no modificada o la de una molécula nativa.

Los compuestos GLP-1 para uso en la presente invención se pueden preparar usando procedimientos estándar de técnicas de síntesis de péptidos en fase de solución o en fase sólida.

Una vez que se ha preparado y purificado un compuesto GLP-1, se PEGila uniendo covalentemente dos moléculas de PEG al compuesto PLG-1. Se han descrito en la técnica una variedad de métodos para conjugar covalentemente PEG a péptidos (para artículos de recapitulación, véase Roberts, M, y otros, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002). La PEGilación de péptidos en el terminal carboxi se puede realizar mediante acoplamiento enzimático usando péptido PLG-1 recombinante como precursor o por procedimientos alternativos conocidos y descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, patente U.S. nº. 4.343.898 o *International Journal of Peptide & Protein Research*, 43: 127-38, 1994. Un procedimiento para preparar los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención implica el uso de PEG-maleimida para unir directamente PEG a un grupo tiol del péptido. La introducción de una funcionalidad tiol se puede lograr añadiendo o insertando un resto Cys sobre o en el péptido en las posiciones descritas antes. También se puede introducir una funcionalidad tiol en la cadena lateral del péptido (por ejemplo, acilación del grupo  $\epsilon$ -aminoácido de lisina). Un procedimiento de PEGilación de la presente invención utiliza la adición de Michael para formar un conector tioéter estable. La reacción es muy específica y tiene lugar en condiciones suaves en presencia de otros grupos funcionales. Se ha usado PEG maleimida como polímero reactivo para preparar conjugados de PEG-proteína bioactivos bien definidos. Es preferible usar en el procedimiento un exceso molar de un compuesto GLP-1 que contiene tiol en relación a PEG maleimida para conducir la reacción hasta que sea completa. Preferiblemente, las reacciones se realizan a pH entre 4,0 y 9,0 a temperatura ambiente durante 1 a 40 horas. El exceso de péptido que contiene tiol que no se ha PEGilado se separa fácilmente del producto PEGilado por métodos de separación convencionales. Las condiciones ejemplares requeridas para la PEGilación de compuestos GLP-1 se presentan en el Ejemplo 1 y 2. La PEGilación de cisteína se puede realizar usando PEG maleimida o PEG maleimida bifurcado. Un PEG preferido es metoxi PEG maleimida lineal de 20 kilodalton.

En su forma típica, el PEG es un polímero lineal con grupos terminales hidroxilo y tiene la fórmula  $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , siendo  $n$  de aproximadamente 8 a aproximadamente 4000. El hidrógeno terminal puede estar sustituido con un grupo protector tal como un grupo alquilo o arilo. Preferiblemente, el PEG tiene como mínimo un grupo hidroxilo, más preferiblemente es un grupo hidroxiterminal. Es este grupo hidroxilo el que preferiblemente



se activa para que reaccione con el péptido. Hay muchas formas de PEG útiles para la presente invención. Existen en la técnica numerosos derivados de PEG que son útiles para uso en la invención. (Véanse, por ejemplo, patentes U.S. nº. 5.445.090, nº. 5.900.461, nº. 5.932.462, nº. 6.436.386, nº. 6.448.369, nº. 6.437.025, nº. 6.448.369, nº. 6.495.659, nº. 6.515.100 y nº. 6.514.491, y Zalipsky, S. Bioconjugate Chem. 6:150-165, 1995). La molécula de PEG unida covalentemente a los compuestos GLP-1 de la presente invención no está limitada a ser de un tipo particular. Preferiblemente, el peso molecular del PEG es de 500-100.000 daltons, más preferiblemente, de 20.000-60.000 daltons y, muy preferiblemente, de 20.000-40.000 daltons. El PEG puede ser lineal o ramificado.

Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen una actividad biológica in vitro que como mínimo es 0,5% de la de GLP-1 nativo o de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH. Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen una actividad biológica in vitro que como mínimo es el 1% de la de GLP-1 nativo o de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH. Preferiblemente, los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen una actividad biológica in vitro que como mínimo es el 3% de la de GLP-1 nativo o de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH. Tal actividad biológica se puede determinar por el ensayo de potencia in vitro descrito aquí (Ejemplo 3) o por otros ensayos de GLP-1 conocidos en la técnica. Aunque algunos compuestos GLP-1 PEGilados de la invención pueden tener una actividad biológica más baja que la de GLP-1 nativo o de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH medidas en un ensayo particular, esta menor actividad es compensada por los compuestos de semivida extendida y/o de un valor del aclaramiento más bajo.

La administración de los compuestos GLP-1 PEGilados puede realizarse por cualquier vía conocida como eficaz por un médico de pericia normal. La vía parenteral periférica es una de tales vías. Por administración parenteral se entiende comúnmente en la bibliografía médica la inyección de una forma farmacéutica en el cuerpo con una jeringa estéril o algún otro dispositivo tal como una bomba de infusión. Las vías parenterales periféricas incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención también son aptos para administración por las vías oral, rectal, nasal o de las vías respiratorias inferiores, que son vías no parenterales. De estas vías no parenterales, se prefieren las vías respiratorias inferiores y la oral.

Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención se pueden usar para tratar una amplia variedad de enfermedades y afecciones. Los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención ejercen principalmente sus efectos biológicos actuando en un receptor denominado el "receptor de GLP-1". Consecuentemente, los sujetos con enfermedades y/o afecciones que responden favorablemente a la estimulación por el receptor de GLP-1 o a la

administración de compuestos GLP-1 pueden ser tratados con los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención. Se dice que estos compuestos “tienen necesidad de tratamiento con compuestos GLP-1” o “necesitan estimulación del receptor de GLP-1”. Están incluidos sujetos con diabetes no dependiente de insulina, diabetes insulino dependiente, accidente cerebrovascular (véase WO 00/16797), infarto de miocardio (véase WO 98/08531), obesidad (véase WO 98/19698), cambios catabólicos después de cirugía (véase patente U.S. nº. 6.006.753), dispepsia funcional y síndrome de intestino irritable (véase WO/99/64060). También están incluidos sujetos que requieren tratamiento profiláctico con un compuesto GLP-1, por ejemplo, sujetos con riesgo de que desarrollen diabetes no dependiente de insulina (véase WO 00/7617). Los sujetos con tolerancia empeorada a la glucosa o glucosa en ayunas empeorada, los sujetos cuyo peso corporal es de aproximadamente un 25% por encima del peso corporal normal para la altura del sujeto y la constitución del cuerpo, sujetos con pancreatectomía parcial, los sujetos que tienen un progenitor o los dos con diabetes no dependiente de insulina y los sujetos que han tenido diabetes gestacional y sujetos que han tenido pancreatitis aguda o crónica tienen riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina.

Una cantidad eficaz de los compuestos GLP-1 PEGilados descritos aquí es la cantidad que da por resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administran a un sujeto que necesita la estimulación del receptor de GLP-1. Un “efecto terapéutico deseado” incluye uno o varios de los siguientes: (1) mejora del (los) síntoma(s) asociado(s) con la enfermedad o la afección; (2) una demora en la aparición de síntomas asociados con la enfermedad o la afección; (3) una longevidad acrecentada en comparación con la carencia de tratamiento, y (4) mayor calidad de vida en comparación con la carencia de tratamiento. Por ejemplo, una “cantidad eficaz” de un compuesto GLP-1 PEGilado para el tratamiento de la diabetes es la cantidad que daría por resultado un mayor control de la glucemia que en carencia de tratamiento, dando por resultado una demora en la aparición de complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía o enfermedad renal. Una “cantidad eficaz” de un compuesto GLP-1 PEGilado para la prevención de la diabetes es la cantidad de demoraría, en comparación con la carencia de tratamiento, la aparición de niveles altos de glucemia

que requerirían tratamiento con fármacos antihiper glucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidindionas, metformín, insulina y/o bisguanidinas. Típicamente, los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención se administrarán de manera que los niveles en plasma estén en el intervalo de aproximadamente 5 picomoles/litro a aproximadamente 200

picomoles/litro. Los niveles óptimos para Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH se determinó que son de entre 30 picomoles/litro y aproximadamente 200 picomoles/litro.

La dosis de un compuesto PLG-1 PEGilado eficaz para normalizar la glucemia en sangre de un paciente dependerá de varios factores, entre los que figuran, no limitativamente, el sexo, peso y edad del sujeto, el grado de incapacidad para regular la glucemia, la vía de administración y la biodisponibilidad, el perfil farmacocinético del compuesto PLG-1 PEGilado, la potencia y la formulación. Un intervalo de dosis típico para los compuestos PLG-1 PEGilados de la presente invención será de aproximadamente 0,01 mg por día a aproximadamente 1000 mg por día para un adulto. Preferiblemente, la dosificación varía de aproximadamente 0,1 mg por día a aproximadamente 100 mg por día, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg por día a aproximadamente 10 mg por día.

Es preferible que los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención sean administrados una vez cada dos semanas o una vez a la semana. Dependiendo de la enfermedad que se esté tratando, puede ser necesario administrar los compuestos GLP-1 PEGilados con una frecuencia mayor, como puede ser dos o tres veces por semana.

Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un ser humano, pero puede ser también un animal, por ejemplo animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (vacas, ovejas, cerdos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo ratas, ratones, cobayas y similares).

Los péptidos usados para generar los compuestos GLP-1 PEGilados de la presente invención se pueden preparar usando procedimientos estándar de técnicas de síntesis de péptidos en fase de solución o fase sólida.

La invención se ilustra con los ejemplos siguientes.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. PEGilación de análogos relacionados con GLP-1

Las reacciones de PEGilación se realizan en condiciones que permiten la formación de un enlace tioéter. Específicamente, el pH de la solución varía de aproximadamente 4 a 9 y las concentraciones de péptido que contiene tiol varían de un exceso 1 a 10 molar de la concentración de metoxi-PEG2-MAL. Normalmente las reacciones de PEGilación tienen lugar a temperatura ambiente. El péptido GLP-1 PEGilado se aísla luego usando cromatografía de intercambio iónico HPLC en fase inversa, o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los análogos de GLP-1 PEGilados se caracterizan usando técnicas analíticas de RP-HPL, HPLC-SEC, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas MALDI.

Los péptidos GLP-1 que contiene tiol se hacen reaccionar con polietilenglicol-maleimida (PEG-maleimida) para producir derivados con PEG unido por covalencia mediante un enlace tioéter. Por ejemplo, se disuelven 7,5 mg, 1,8  $\mu$ mol, de un compuesto GLP-1 de una longitud de 46aa, en 2 ml de tampón de fosfato 200 mM que contiene EDTA 20 mM, pH 7,4. La solución se purga luego con argón. A esta solución se añaden 40 mg de metoxi-PEG-MAL, un PEG maleimida lineal o bifurcado (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama) (relación molar de PEG a péptido 0,55:1). La reacción se realiza durante dos horas. Luego se purifican 25 mg del péptido PEGilado por RP-HPLC, se caracteriza por HPLC de exclusión por tamaño y se ensaya en cuanto a su actividad in vitro.

#### Ejemplo 2. Reacción de 2X20kDA-PEG-maleimida con análogos de GLP

Se PEGilan selectivamente análogos de GLP-1 en los restos de cisteína introducidos usando PEGm lineal de 20 kDA activado con maleimida (NOF, Inc.). Para la reacción de PEGilación, el péptido a PEGilado se disuelve en tampón de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  100 mM que contiene EDTA 10 mM a pH 6,8 y se añade un exceso 1,25 veces molar de PEGm de 20 kDA, de granel. Se deja en agitación la mezcla de reacción durante 1-4 horas a temperatura ambiente y se usa cromatografía de intercambio catiónico SP-Sefarosa para separar el compuesto PEGilado del PEG libre y el péptido libre. Se desala el conjugado por RP-HPLC y se liofiliza.

#### Ejemplo 3. Ensayo de actividad in vitro

Se siembran células HEK-293 que expresan establemente el receptor GLP-1 humano, usando un sistema CRE-Luciferasa, a 30.000 células/pocillo/80  $\mu$ l de medio DMEM F12 de bajo suero en placas de 96 pocillos. El día siguiente de la siembra, se mezclan partes alícuotas de 20  $\mu$ l de proteína de ensayo disuelta en 0,5% de BSA y se incuban con las células durante 5 horas. Generalmente se preparan 10 diluciones que contienen de 0,001 nM a 10 nM para el ensayo de los compuestos GLP-1 y se preparan 0,0003 nM y 3 nM para el patrón de  $\text{Val}_8\text{-GLP-1(7-37)OH}$  antes de añadir a las células para generar una curva de dosis-respuesta a partir de la cual se determinan los valores de  $\text{CE}_{50}$ . Después de la incubación, se añaden 100  $\mu$ l del reactivo de luciferasa a cada placa y se mezcla suavemente durante 2 minutos. Se ponen las placas en un luminómetro Tri-lux y se calcula la luz resultante de la expresión de luciferasa. El valor medio de  $\text{CE}_{50}$  para el compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I, en la que  $\text{Xaa}_8$  es Val;  $\text{Xaa}_{22}$  es Glu;  $\text{Xaa}_{33}$  es Ile y  $\text{Xaa}_{46}$  es Cys es  $0,22 \pm 0,3$  nM. El valor medio de  $\text{CE}_{50}$  para el compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I en la que  $\text{Xaa}_8$  es Val;  $\text{Xaa}_{22}$  es Glu;  $\text{Xaa}_{33}$  es Ile y  $\text{Xaa}_{46}$  es Cys- $\text{NH}_2$  es  $0,36 \pm 0,04$  nM.

**Ejemplo 4. Análisis farmacocinético del péptido GLP-1 derivatizado**

Se administra un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I, en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>, por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC) a una dosis de 0,1 mg/kg a ratas macho SD. Los animales (3 ratas por grupo) se sangran en varios momentos entre 0 y 192 horas después de la administración. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo específico de N-terminal. Se calculan los parámetros farmacocinéticos usando procedimientos no compartimentales (WinNonlin Pro). Por administración IV, el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 1,2 días. mientras que por administración SC el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 1,1 días. No se observan efectos adversos asociados con la administración IV o SC de 0,1 mg/kg. Para el compuesto se observa una semivida de eliminación prolongada, un aclaramiento lento y biodisponibilidad (aproximadamente 30%). Los datos representativos se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores medios ( $\pm$  d.e.) del parámetro PK para un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>, después de administración intravenosa o subcutánea de 0,1 mg/kg a ratas SD macho

Vía	C <sub>max</sub> <sup>a</sup>	T <sub>max</sub> <sup>b</sup> h	AUC <sub>0-últ</sub> <sup>c</sup> ng*h/ml	t <sub>1/2</sub> <sup>d</sup> h	CL/F <sup>e</sup> ml/h/kg	V <sub>ee</sub> /F <sup>f</sup> ml/kg
IV	2020 (235)	0,08 (0,00)	52292 (4546)	25,8 (2,2)	1,9 (0,2)	54 (2,5)
SC	191	24,0	15423	28,3	6,5	268
SD	(31)	(0,0)	(2821)	(0,8)	(1,2)	(56)

<sup>a</sup> Concentración máxima en plasma observada.

<sup>b</sup> Tiempo de concentración máxima en plasma observada.

<sup>c</sup> Superficie medida bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el punto 0 al punto del último tiempo.

<sup>d</sup> Semivida de eliminación.

<sup>e</sup> Aclaramiento total del cuerpo en función de la biodisponibilidad.

<sup>f</sup> Volumen de distribución en estado estacionario en función de la biodisponibilidad.

Cuando se administra Val<sub>8</sub>-GLP(7-37)OH análogamente por IV a ratas Fisher 344 a una dosis de 10 µg/kg, se obtienen valores muy diferentes del aclaramiento y la semivida, como se indica seguidamente.

Aclaramiento. 1449 ml/h/kg

$t_{1/2}$  (h) : 0,05

#### Ejemplo 5. Análisis farmacocinético de péptido GLP-1 derivatizado

Se administra un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I, en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>, por vía subcutánea (SC) a una dosis de 0,01 mg/kg a monos macaco machos. Los animales se sangran en varios momentos entre 0 horas y 168 horas después de la administración. Se recoge suero de cada muestra y se analiza por ensayo radioinmune específico N-terminal. Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando procedimientos no compartimentales (WinNonlin Pro.). Los datos representativos se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Valores medios ( $\pm$  d.e.) del parámetro PK para un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>, después de administración subcutánea de 0,01 mg/kg a monos macaco machos

Animal n <sup>o</sup> .	C <sub>max</sub> <sup>a</sup>	T <sub>max</sub> <sup>b</sup> h	AUC <sub>0-últ</sub> <sup>c</sup> ng*h/ml	$t_{1/2}$ <sup>d</sup> h	CL/F <sup>e</sup> ml/h/kg	V <sub>ee</sub> /F <sup>f</sup> ml/kg
Media	69,49	48	7464,78	75,69	1,06	117,15
d.e.	17,07	0	1612,03	11,67	0,26	44,89

Abreviaturas: d.e. : desviación estándar

<sup>a</sup> Concentración máxima en plasma observada.

<sup>b</sup> Tiempo de concentración máxima en plasma observada.

<sup>c</sup> Superficie medida bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el punto 0 al punto del último tiempo.

<sup>d</sup> Semivida de eliminación.

<sup>e</sup> Aclaramiento total del cuerpo en función de la biodisponibilidad.

<sup>f</sup> Volumen de distribución en estado estacionario en función de la biodisponibilidad.

**Ejemplo 6.** Análisis farmacodinámico del péptido GLP-1 derivatizado

Se administra un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I, en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>, por vía subcutánea (SC) a una dosis de 0,01 mg/kg a monos macaco machos. Inmediatamente Después de la administración SC de vehículo de control (solución salina tamponada con fosfato) y 1, 5 y 7 días después de administración SC de 0,01 mg/kg de análogo de GLP-1 PEGilado se realiza una infusión intravenosa escalonada de glucosa. Los procedimientos de infusión intravenosa escalonada de glucosa se realizan en monos sedados después de 16 horas de ayuno. Se extraen muestras de sangre 10 minutos antes de iniciar la infusión de glucosa e inmediatamente antes de la infusión de glucosa para definir la línea base. Luego se inicia una infusión escalonada de glucosa (20% de dextrosa) a una velocidad de 10 mg/kg/min durante 20 minutos seguida de una infusión de 25 mg/kg/min durante 20 minutos más. Se extraen muestras de sangre a intervalos de 10 minutos a lo largo del período de infusión. Se determinan por inmunoensayo los niveles de insulina. La actividad insulínica se demuestra durante al menos 7 días (en relación a placebo; p<0,0001) después de una única inyección SC de 0,01 mg/kg del análogo de GLP-1 PEGilado. Los datos representativos se muestran en la siguiente Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros medios FD ( $\pm$  d.e.) para un compuesto GLP-1 PEGilado de fórmula I, en la que Xaa<sub>8</sub> es Val; Xaa<sub>22</sub> es Glu; Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub> después de administración subcutánea de 0,01 mg/kg a monos macacos machos.

**AUC de insulina**

Grupo		AUC <sub>Últ</sub> (pM*min)
Vehículo	<b>Media</b>	<b>14983</b>
	DE	5789
	ES	2363
Día 1	<b>Media</b>	<b>30862</b>
	DE	10770
	ES	4397
Día 5	<b>Media</b>	<b>27203</b>
	DE	6507
	ES	2657
Día 8	<b>Media</b>	<b>28542</b>
	DE	7685
	ES	3137

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Eli Lilly and Company  
<120> Compuestos GLP-1 pegilados  
5 <120> X-17063  
<160> 1
- <170> Patentin versión 3.3
- 10 <210> 1  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> artificial
- 15 <220>  
<223> construcción sintética
- <220>  
<221> RASGO-MIST
- 20 <222> (2)..(2)  
<223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr
- <220>  
<221> RASGO\_MISC
- 25 <222> (2)..(2)  
<223> Ala es isómero D
- <220>  
<221> RASGO\_ MISC
- 30 <222> (16)..(16)  
<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glue, Asp o Lys
- <220>  
<221> RASGO\_MISC
- 35 <222> (27)..(27)



16

&lt;223&gt; Xaa en la posición 27 es Val o Ile

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; RASGO\_MISC

5 &lt;222&gt; (40)..(40)

<223> Xaa en la posición 40 es Cys o Cys-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt;

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Xaa	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Cys	Xaa
		35				40	

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado que comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula:

5

**His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys<sub>45</sub>- Xaa<sub>46</sub>** **Fórmula I (SEC. ID. NO: 1)**

en la que Xaa<sub>8</sub> es: D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

Xaa<sub>22</sub> es: Gly, Glu, Asp o Lys;

10 Xaa<sub>33</sub> es: Val o Ile;

Xaa<sub>46</sub> es: Cys o Cys-NH<sub>2</sub>;

y en el que una molécula de PEG está unida covalentemente a Cys<sub>45</sub> y una molécula de PEG está unida covalentemente a Cys<sub>46</sub> o Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub>.

15 2. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Xaa<sub>8</sub> es Gly o Val, y Xaa<sub>22</sub> es Gly o Glu.

3. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que Xaa<sub>8</sub> es Val y Xaa<sub>22</sub> es Glu.

20

4. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que Xaa<sub>8</sub> es Val, Xaa<sub>22</sub> es Glu, Xaa<sub>33</sub> es Ile y Xaa<sub>46</sub> es Cys-NH<sub>2</sub>.

25 5. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las moléculas de PEG tienen pesos moleculares entre 5.000 y 40.000 daltons.

30 6. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las moléculas de PEG tienen pesos moleculares entre 20.000 y 60.000 daltons.

7. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las moléculas de PEG tienen pesos moleculares entre 20.000 y 40.000 daltons.
- 5 8. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada una de las moléculas de PEG usadas en una reacción de PEGilación es una metoxiPEGmaleimida lineal de 20.000 dalton.
9. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las  
10 reivindicaciones precedentes, en el que las moléculas de PEG se unen simultáneamente.
10. Un compuesto GLP-1 di-PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un conector que comprende los sitios de PEGilación Cys<sub>45</sub> y Cys<sub>46</sub> o Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub> está unido al extremo C del compuesto GLP-1.
- 15 11. El compuesto GLP-1 di-PEGilado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso como medicamento.
12. El compuesto GLP-1 di-PEGilado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para  
20 uso en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina o la obesidad.
13. Uso de un compuesto GLP-1 di-PEGilado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina o la obesidad.