

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 313**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2006 E 10169546 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2322546**

54 Título: **Compuestos GLP-1 acilados**

30 Prioridad:

18.03.2005 EP 05102171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2016

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Corporate Patents, Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**LAU, JESPER;
DÖRWALD, FLORENCIO ZARAGOZA;
STEPHENSEN, HENRIK;
BLOCH, PAW;
HANSEN, THOMAS KRUSE y
MADSEN, KJELD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 557 313 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

Compuestos GLP-1 acilados.

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere al campo de los péptidos terapéuticos, a saber, a nuevos compuestos GLP-1 de acción prolongada.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una serie de enfoques diferentes han sido utilizados para modificar la estructura de compuestos del péptido 1 afín a glucagón (GLP-1) a fin de proporcionar una mayor duración de acción in vivo. WO 96/29.342 da a conocer derivados de hormonas peptídicas en los que la hormona peptídica parental ha sido modificada por introducción de un sustituyente lipófilo en el residuo de aminoácido C-terminal o en el residuo de aminoácido N-terminal.

WO 98/08871 da a conocer derivados de GLP-1 en los que al menos un residuo de aminoácido del péptido parental tiene un sustituyente lipófilo unido.

20 WO 99/43708 da a conocer derivados de GLP-1 (7-35) y GLP-1 (7-36) que tienen un sustituyente lipófilo unido al residuo de aminoácido C-terminal.

WO 00/34331 da a conocer análogos de GLP-1 acilados.

25 WO 00/69911 da a conocer péptidos insulínótropicos activados para ser inyectados a pacientes en los que se supone que los mismos reaccionan con componentes de la sangre para formar conjugados y que proporcionan de este modo supuestamente mayor duración de acción in vivo.

30 WO 02/46.227 da a conocer análogos de GLP-1 y exendina-4 fusionados a seroalbúmina humana con objeto de prolongar la semivida in vivo. J. Med. Chem., 2000, 43, 1664-1669 da a conocer derivados de GLP-1 con propiedades farmacocinéticas adecuadas para administración una vez al día.

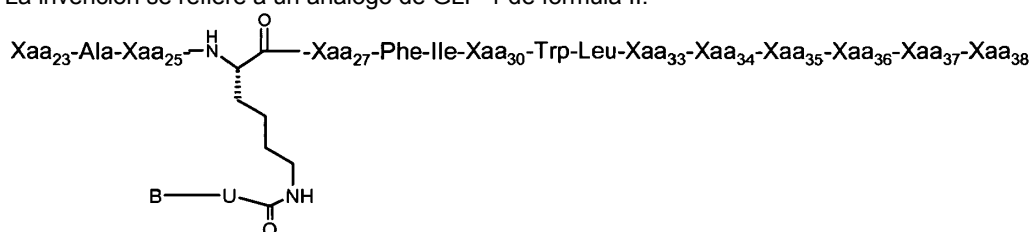
Diabetologia, 1998, 41, 271-278 da a conocer análogos resistentes a la dipeptidilpeptidasa IV de GLP-1 con estabilidad metabólica extendida y actividad biológica mejorada.

35 J. Med. Chem., 2004, 47, 4128-4134 da a conocer el uso de GLP-1 como base para una nueva clase de tratamiento de la diabetes tipo 2.

40 Muchos pacientes de diabetes, particularmente el segmento de la diabetes tipo 2, padecen la denominada "fobia a las agujas", un temor sustancial a inyectarse por sí mismos. En el segmento de la diabetes tipo dos, la mayoría de los pacientes se tratan con agentes hipoglucémicos orales, y puesto que cabe esperar que los compuestos GLP-1 sean el principal producto inyectable a administrar a estos pacientes, el temor de las inyecciones puede convertirse en un obstáculo grave para el uso extendido de los compuestos GLP-1 clínicamente muy prometedores. Por ello, existe necesidad de desarrollar nuevos compuestos GLP-1 que puedan administrarse menos de 1 vez al día, v.g. una vez cada dos o tres días, preferiblemente una vez por semana, al tiempo que retengan un perfil clínico aceptable.

SUMARIO DE LA INVENCION

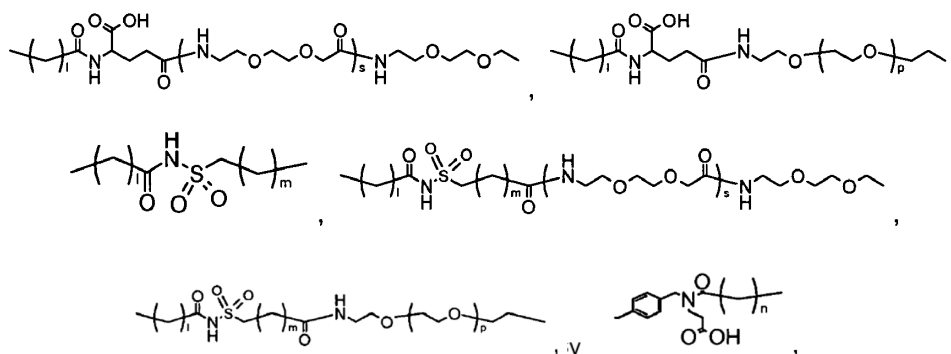
50 La invención se refiere a un análogo de GLP-1 de fórmula II:



en donde

Xaa₇ es L-histidina; Xaa₈ es Aib; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly o Aib; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Arg;

55 Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Gly; Xaa₃₈ está ausente; y donde U es un espaciador seleccionado de



5

donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18,

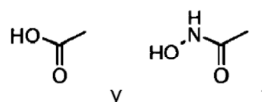
l es 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18,

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6,

10 s es 0, 1, 2 ó 3,

p es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23; y

donde B es un grupo ácido seleccionado de



y

15 Este análogo de GLP-1 tiene una modificación de al menos un residuo de aminoácido no proteogénico en posición 8 con relación a la secuencia de GLP-1 (7-37) (SEQ ID No. 1), y está acilado con un resto en el residuo lisina en posición 26, y dicho resto comprende al menos dos grupos ácidos, uno de los cuales está unido en posición terminal.

20 La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto conforme a la presente invención y el uso de compuestos conforme a la presente invención para preparación de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25

En la presente memoria descriptiva, los términos que siguen tienen el significado que se indica:

El término "polipéptido" y "péptido", como se utiliza en esta memoria, significa un compuesto constituido por al menos 5 aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no están codificados por código genético, así como aminoácidos sintéticos. Aminoácidos naturales que no están codificados por el código genético son v.g., γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden aminoácidos producidos por síntesis química, a saber D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometil-benzoico y ácido antranílico.

Los 22 aminoácidos proteogénicos son:

40 Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

Así, un aminoácido no proteogénico es un resto que puede incorporarse en un péptido por enlaces peptídicos, pero no es un aminoácido proteogénico. Ejemplos son γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, los D-aminoácidos tales como D-alanina y D-glutamina. Aminoácidos no proteogénicos sintéticos comprenden aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), ácido 3-aminometil-benzoico, ácido antranílico, des-amino-histidina, los β -análogos de aminoácidos tales como β -alanina, etc., D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homo-histidina, N³-acetil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina, ácido (1-aminociclopropil)-carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil-carboxílico), ácido (1-aminociclohexil)-carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)-carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)-carboxílico.

El término "análogo", como se utiliza en esta memoria, con referencia a un polipéptido significa un péptido modificado en el cual uno o más residuos aminoácido del péptido ha(n) sido sustituido(s) por otros residuos de aminoácido y/o en el cual uno o más residuos de aminoácido ha(n) sido delecionado(s) del péptido y/o en el cual uno o más residuos de aminoácido han sido añadidos al péptido. Dicha adición o deleción de residuos de aminoácido puede tener lugar en el terminal N del péptido y/o en el terminal C del péptido. A menudo se utiliza un sistema simple para describir los análogos: por ejemplo [Arg³⁴]GLP-1 (7-37)Lys designa un análogo de GLP-1(7-37) en el que la lisina existente naturalmente en la posición 34 ha sido sustituida con arginina y en el que se ha añadido una lisina al residuo de aminoácido terminal, es decir al Gly³⁷. Todos los aminoácidos para los cuales no se indica el isómero óptico, debe entenderse que significan el isómero L. En algunas realizaciones de la invención, se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En algunas realizaciones de la invención, se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En algunas realizaciones de la invención se ha modificado un solo aminoácido.

El término "derivado", como se utiliza en esta memoria, en relación con un péptido significa un péptido modificado químicamente o un análogo del mismo, en donde al menos un sustituyente no está presente en el péptido no modificado o un análogo del mismo, es decir un péptido que ha sido modificado covalentemente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y análogos. Un ejemplo de un derivado de GLP-1 (7-37) es L²⁶-(4S)-4-(hexadecanoilamino)-carboxi-butaniloil[Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1-(7-37).

El término "péptido GLP-1", como se utiliza en esta memoria, significa GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1), un análogo de GLP-1(7-37), un derivado de GLP-1(7-37) o un derivado de un análogo de GLP-1(7-37). En una realización, el péptido GLP-1 es un agente insulínico.

El término "agente insulínico", como se utiliza en esta memoria, significa un compuesto que es un agonista del receptor de GLP-1 humano, es decir un compuesto que estimula la formación de cAMP en un medio adecuado que contiene el receptor GLP-1 humano (un medio de este tipo descrito más adelante). La potencia un agente insulínico se determina por cálculo del valor CE₅₀ a partir de la curva dosis-respuesta como se describe más adelante.

Células de riñón de cría de hámster (BHK) que expresaban el receptor de GLP-1 humano clonado (BHK-467-12A) se dejaron crecer en medio DMEM con la adición de 100 UI/mL penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 5% suero de ternero fetal y 0,5 mg/ml Geneticina G-418 (Life Technologies). Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato y se cosecharon con Versene. Se prepararon membranas plasmáticas a partir de las células por homogeneización con un Ultraturax en tampón 1 (HEPES-Na 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4). El homogeneizado se centrifugó a 48.000 x g durante 15 min a 4°C. El pellet se suspendió por homogeneización en tampón 2 (HEPES-Na 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4), y se centrifugó luego a 48.000 x g durante 15 min a 4°C. El procedimiento de lavado se repitió una vez más. El pellet final se suspendió en tampón 2 y se utilizó inmediatamente para ensayos o se guardó a -80°C.

El ensayo de receptores funcionales se llevó a cabo por medida de AMP cíclico (cAMP) como respuesta a la estimulación por el agente insulínico. El cAMP formado se cuantificó por el kit cAMP AlphaScreenTM (Perkin Elmer Life Sciences). Se realizaron incubaciones en placas de microtitulación de semiárea con 96 pocillos en un volumen total de 50 µl de tampón 3 (Tris-HCl 50 mM, HEPES 5 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,4) y con las adiciones siguientes: ATP 1 mM, GTP 1 µM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, 0,01% Tween-20, 0,1% BSA, 6 µg de preparación de membranas, 15 µg/ml de perlas aceptoras, 20 µg/ml de perlas donantes preincubadas con biotilil-cAMP 6 nM. Los compuestos a testar respecto a actividad agonista se disolvieron y se diluyeron en tampón 3. Se preparó GTP nuevo para cada experimento. La placa se incubó en la oscuridad con agitación lenta durante 3 horas a la temperatura ambiente seguido por recuento en el instrumento PhusionTM (Perkin Elmer Life Sciences). Se representaron gráficamente curvas concentración-respuesta para los compuestos individuales y se estimaron los valores CE₅₀ utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros con Prism v 4.0 (GraphPad, Carlsbad, CA).

El término protegido de DPP-IV", como se utiliza en esta memoria, haciendo referencia a un polipéptido significa un polipéptido que se ha modificado químicamente a fin de hacer dicho compuesto resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil-aminopeptidasa-4 (DPP-IV). Es sabido que la enzima DPP-IV en el plasma está implicada en la degradación de varias hormonas peptídicas, v.g. GLP-1, GLP-2 Exendina-4, etc. Así pues, se está realizando un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos susceptibles de hidrólisis mediada por DPP-IV a fin de reducir la tasa de degradación por DPP-IV. En una realización, un péptido protegido de DPP-IV es más resistente a DPP-IV que GLP-1 (7-37) o Exendina-4 (1-39).

La resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil-aminopeptidasa IV se determina por el ensayo de degradación siguiente:

Se incuban partes alícuotas del péptido (5 nanomoles) a 37°C con 1 µl de dipeptidil-aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 µl de tampón trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Las reacciones enzimáticas se terminan por la adición de 5 µl de ácido

trifluoroacético al 10%, y los productos de degradación peptídica se separan y se cuantifican utilizando análisis HPLC. Un método para la realización de este análisis es como sigue: se aplican las mezclas a una columna Vydac C18 de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) de 250 x 4,6 mm y se eluyen a un caudal de 1 mL/min con gradientes lineales escalonados de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% (0% acetonitrilo durante 3 min, 0-24% acetonitrilo durante 17 min, 24-48% acetonitrilo durante 1 min) conforme a Siegel et al., Regul. Pept. 1999; 79: 93-102 y Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993; 214: 829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden monitorizarse por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de sus áreas de pico relacionadas con las de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un péptido por la dipeptidil-aminopeptidasa IV se estima en tiempos de incubación, lo que da como resultado una hidrólisis del péptido menor de 10%.

El término "C₁₋₆-alquilo", como se utiliza en esta memoria, significa un grupo hidrocarbonado saturado, ramificado, lineal o cíclico que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero sin carácter limitante, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, *terc*-pentilo, n-hexilo, isohexilo, ciclohexano y análogos. El término "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en esta memoria, significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir que no da lugar a efecto adverso alguno en los pacientes, etc.

El término "excipiente", como se utiliza en esta memoria, significa los compuestos químicos que se añaden normalmente a composiciones farmacéuticas, v.g. tampones, agentes de tonicidad, conservantes y análogos.

El término "cantidad eficaz", como se utiliza en esta memoria, significa una dosis que es suficiente para ser eficaz para el tratamiento del paciente comparado con la ausencia de tratamiento.

El término "composición farmacéutica", como se utiliza en esta memoria, significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal del mismo junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante, y opcionalmente un modificador de la tonicidad y/o un estabilizador. Así, una composición farmacéutica se conoce también en la técnica como formulación farmacéutica.

El término "tratamiento de una enfermedad", como se utiliza en esta memoria, significa la atención y el cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, afección o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, trastorno o afección y para aliviar los síntomas o complicaciones asociados con la enfermedad, afección o trastorno.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo acilado de GLP-1 que puede fijarse a albúmina y al receptor GLP-1 simultáneamente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo acilado de GLP-1 que se fija al receptor de GLP-1 con una afinidad inferior a 100 nM, preferiblemente inferior a 30 nM en presencia de 2% de albúmina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 acilado cuya afinidad para el receptor GLP-1 es sólo parcialmente reducida cuando se compara la afinidad en presencia de una concentración muy baja (v.g. 0,005% a 0,2%) de albúmina humana con la afinidad en presencia de 2% de albúmina humana. El cambio en afinidad de fijación en estas condiciones es menor que 50 veces, preferiblemente inferior a 30 veces y más preferiblemente inferior a 10 veces.

El término "resto de fijación de albúmina", como se utiliza en esta memoria, significa un residuo que se fija de modo no covalente a seroalbúmina humana. El residuo de fijación de albúmina unido al polipéptido terapéutico tiene típicamente una afinidad inferior a 10 µM a la seroalbúmina humana y preferiblemente inferior a 1 µM. Una serie de residuos de fijación de albúmina se conocen entre restos lipófilos lineales y ramificados que contienen 4-40 átomos de carbono que tienen un grupo ácido distal.

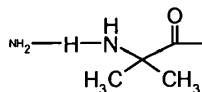
El término "enlazador hidrófilo", como se utiliza en esta memoria, significa un espaciador que separa un péptido y un residuo de fijación de albúmina con un resto químico que comprende al menos 5 átomos distintos de hidrógeno en los que 30 a 50% de éstos son N u O.

El término "grupos ácidos", como se utiliza en esta memoria, significa grupos químicos orgánicos que llevan total o parcialmente carga negativa al pH fisiológico. El valor pKa de tales grupos es inferior a 7, preferiblemente inferior a 5. Esto incluye, pero sin carácter limitante, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfóricos o sistemas de anillos heterocíclicos que tienen carga negativa total o parcial al pH fisiológico.

En la forma estructural II siguiente, el resto U es un di-radical que puede estar unido a los grupos terminales B y al grupo amino del aminoácido lisina en el péptido por dos vías diferentes. En algunas realizaciones de la invención, la U en la fórmula II está unida con el grupo B unido en el extremo de la cadena alquilo, y al péptido en el otro extremo.

En las fórmulas que siguen, los enlaces terminales de los grupos unidos deben considerarse como enlaces de unión y que no terminan en grupos metileno a no ser que se indique.

En las fórmulas siguientes



significa el terminal H₂N-His-Aib-N del análogo de GLP-1.

En una realización, la invención proporciona un análogo de GLP-1 acilado con un resto de fijación de albúmina lipófilo que contiene al menos dos grupos químicos ácidos libres unidos por un enlazador de aminoácido no natural al residuo lisina en posición 26.

En una realización, debe entenderse que el término grupos químicos ácidos libres tiene el mismo significado que "grupos ácidos" como se utiliza en esta memoria.

El análogo de GLP-1 acilado está estabilizado contra DPP-IV por modificación de al menos un residuo de aminoácido en las posiciones 7 y 8 con relación a la secuencia de GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1), y donde dicha acilación es un diácido unido al residuo lisina en la posición 26 opcionalmente por un enlazador hidrófilo de aminoácido no natural.

El análogo de GLP-1 tiene una modificación de al menos un residuo aminoácido no proteogénico en posición 8 con relación a la secuencia de GLP-1(7-37) (SEQ ID No. 1), y está acilado con un resto al residuo lisina en posición 26, y dicho resto comprende al menos dos grupos ácidos, en donde un grupo ácido está unido terminalmente.

El resto unido en posición 26 comprende un enlazador hidrófilo.

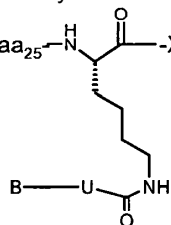
El enlazador hidrófilo comprende al menos 5 átomos distintos de hidrógeno donde 30-50% de éstos son N u O.

El resto unido en la posición 26 comprende un resto de fijación de albúmina separado del péptido por el enlazador hidrófilo.

El compuesto de la invención es un compuesto de fórmula II (SEQ ID No. 3):

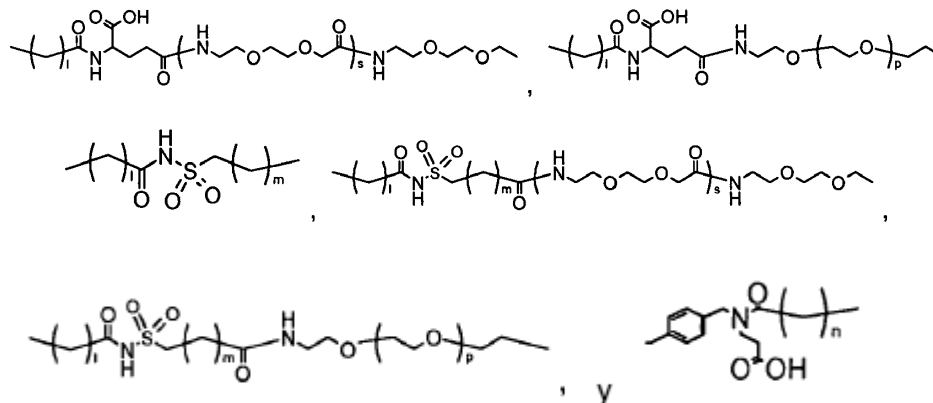
Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-

Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-NH-CH(CH₂CH₂CH₂CH₂NH-C(=O)-NH-U-B)-C(=O)-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈



Fórmula II

En la fórmula II, cada uno de los Xaa's son como se define en la reivindicación 1; U es un espaciador seleccionado de



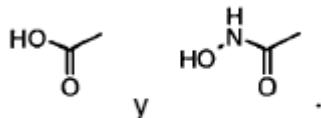
donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18,

Les 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

s es 0, 1, 2 ó 3.

p es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23; y B es un grupo ácido seleccionado de



⁵ Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde s es 1.

Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde n es 1.

10 Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde l es 14, 15 ó 16. En algunas realizaciones l es 17, 18, 19 ó 20. En algunas realizaciones l es 15, 16 ó 17. En algunas realizaciones l es 18, 19 ó 20. En algunas realizaciones l es 14. En algunas realizaciones l es 16. En algunas realizaciones l es 18. En algunas realizaciones l es 20. Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde p es 1.

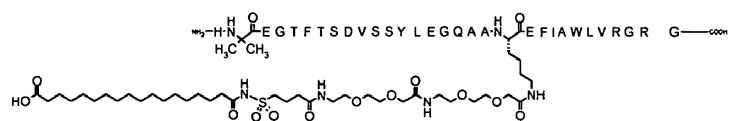
15 Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde p es 2.

Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde p es 3.

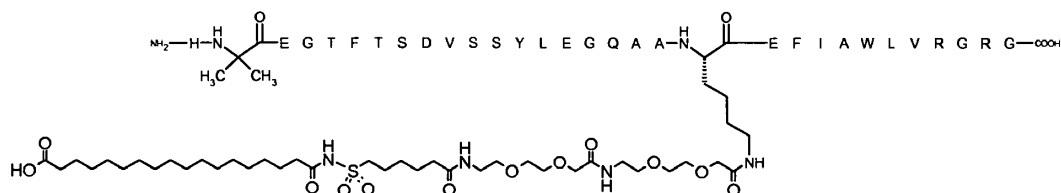
Una realización proporciona un análogo de GLP-1 en donde p es 4.

En una realización de la invención, dicho análogo de GLP-1 es Aib⁸,Arg³⁴-GLP-1(7-37) o Aib^{8,22},Arg³⁴-GLP-1 (7-37).

Una realización proporciona un análogo de GLP-1 que se selecciona de



, and



30 Una realización proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto conforme a la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Una realización proporciona una composición farmacéutica conforme a la realización anterior, que es adecuada para administración parenteral.

Una realización proporciona el uso de un compuesto conforme a la invención para la preparación de un medicamento.

40 Una realización proporciona el uso de un compuesto conforme a la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad de arterias coronarias y otros trastornos cardiovasculares, ictus, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia y úlceras gástricas.

Una realización proporciona el uso de un compuesto conforme a la invención para la preparación de un medicamento para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

Una realización proporciona el uso de un compuesto conforme a la invención para la preparación de un medicamento para disminuir la ingestión de alimentos, disminuir la apoptosis de las células β , aumentar la función de las células β y la masa de células β , y/o para restablecer la sensibilidad de la glucosa a las células β .

- 5 En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto conforme a la invención, en el cual dicho diácido comprende un ácido dicarboxílico.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto conforme a la invención, en el que el grupo de acilación comprende un ácido alcano- α - ω dicarboxílico de cadena lineal o ramificada.

- 10 En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto, en el que el grupo de acilación comprende una estructura seleccionada de $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}-$, y $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$.

- 15 En algunas realizaciones, la invención proporciona un compuesto, en el que el grupo de acilación comprende la estructura $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$.

- Otro ejemplo de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un compuesto conforme a la presente invención que está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 25 mg/ml, y en el que dicha formulación tiene un pH de 3,0 a 9,0. La formulación puede comprender adicionalmente un sistema tampón, uno o más conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizadores y surfactantes. En una realización de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50% p/p de agua. Análogamente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50% p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50% p/p de agua.
- 20
- 25

- 30 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la cual el médico o el paciente añaden disolventes y/o diluyentes antes de su utilización.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (v.g. liofilizada o secada por pulverización) lista para uso sin disolución previa alguna.

- 35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto conforme a la presente invención, y un tampón, en la cual dicho compuesto está presente en una concentración de 0,1 mg/ml o anterior, y en la cual dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0.

- 40 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En otra realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0. En otra realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0. En otra realización de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. En otra realización de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0. En otra realización, la formulación farmacéutica es de 8,0 a 8,5.
- 45

- En una realización adicional de la invención, el tampón se selecciona del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.
- 50

- En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención, el conservante se selecciona del grupo constituido por fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidourea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización, el conservante es fenol o m-cresol. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos
- 55
- 60
- 65

constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19ª, 1995.

- 5 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un agente isotónico. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico se selecciona del grupo constituido por una sal (v.g. cloruro de sodio), un azúcar o azúcar-alcohol, un aminoácido (v.g. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un aldito (v.g. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol, polietilenglicol (v.g. PEG400), o mixturas de los mismos. En una realización, el agente de isotonicidad es propilenglicol. Puede utilizarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil-almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo azúcar es sacarosa. Un azúcar-alcohol se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitól. En una realización, el aditivo azúcar-alcohol es manitol. Los azúcares o azúcar-alcoholes arriba mencionados pueden utilizarse individualmente o en combinación. No existe límite fijo alguno en cuanto a la cantidad utilizada, con tal que el azúcar o azúcar-alcohol sea soluble en la preparación líquida y no afecte desfavorablemente a los efectos estabilizadores alcanzados utilizando los métodos de la invención. En una realización, la concentración de azúcar o azúcar-alcohol está comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 5 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19ª, 1995.
- 30 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un agente quelante. En una realización adicional de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y mixturas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml to 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml to 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19ª, 1995.
- 40 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19ª, 1995.
- 45 Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que exhibe posiblemente formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas del polipéptido que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, si no se administra inmediatamente a un individuo. En lugar de ello, después de la preparación, la misma se envasa para almacenamiento, sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un individuo. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se somete a deshidratación por congelación previa (es decir liofilización); véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59, Spray Drying (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª edición; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o Air Drying (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar desfavorablemente a la actividad biológica de dicho polipéptido, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Adicionalmente, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como obstrucción de tuberías, membranas, o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene el polipéptido utilizando un sistema de infusión.
- 60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente una cantidad de una base de aminoácidos suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la

composición. Por "base de aminoácidos" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en donde cualquier aminoácido dado está presente sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En los casos en que se utiliza una combinación de aminoácidos, la totalidad de los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, pudiendo estar presentes todos ellos en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos para uso en la preparación de las composiciones de la invención son aquéllos que llevan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (a saber, L, D, o una mezcla de los mismos) de una variación particular (v.g. metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la invención, con tal que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma de sal. En una realización, se utiliza el estereoisómero L. Las composiciones de la invención pueden formularse también con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido existente naturalmente que produce el efecto deseado de disminución de la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, análogos de metionina adecuados incluyen metionina y butionina, y análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o su forma de sal. En una realización adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se utilizan en una concentración, que es suficiente para prevenir o retardar la reacción de la proteína.

En una realización adicional de la invención, puede añadirse metionina (u otros aminoácidos sulfurados o análogos de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los residuos metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo metionina susceptible de dicha oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de la metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede utilizarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos. La cantidad a añadir debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos metionina de tal modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto puede conseguirse por adición de metionina de tal modo que la ratio de metionina añadida a residuos metionina está comprendida entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de peso molecular alto o compuestos de peso molecular bajo. En una realización adicional de la invención, el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (v.g. PEG3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxi-celulosa o derivados de los mismos (v.g. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y sales diferentes (v.g. cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes estabilizadores adicionales, que mejoran adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en ellas. Agentes estabilizadores de interés particular para la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con la congelación-descongelación o cizalladura mecánica.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un surfactante. En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende dos surfactantes diferentes. El término "surfactante", como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualesquiera moléculas o iones que están constituidos por una parte soluble en agua (hidrófila), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipófilo). Los surfactantes se acumulan preferiblemente en las interfases, orientándose la parte hidrófila hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase de aceite o hidrófoba (a saber, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la que los surfactantes comienzan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Adicionalmente, los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes se conocen también como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo utilizado para los surfactantes en general.

Los surfactantes **aniónicos** pueden seleccionarse del grupo de ácido quenodesoxicólico, sal de sodio del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N,N-dimetildodecilamina-N-óxido, docusato de sodio, sal de sodio de ácido glicoquenodesoxicólico, hidrato de ácido glicocólico, monohidrato del ácido glicodesoxicólico, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, sal disódica de 3-sulfato de ácido glicolítico, éster etílico de ácido glicolítico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, Lugol, sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico, sal de

sodio de ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, monohidrato de 1-propanosulfonato de sodio, 2-bromoetanosulfonato de sodio, hidrato de colato de sodio, bilis de buey o de oveja, hidrato de colato de sodio, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, monododecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil-sulfonato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal de sodio del ácido tauroquenosodesoxicólico, monohidrato de sal de sodio de ácido taurodesoxicólico, sal disódica de 3-sulfato del ácido tauroilitocólico, sal de sodio del ácido tauroursodesoxicólico, dodecilsulfato Trizma®, DSS (docusato de sodio), registro CAS No. [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS No [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS No. [7491-09-0]), SDS (dodecil-sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), dodecilsulfocolina (FOS-colina-12), decilsulfocolina (FOS-colina-10), nonilsulfocolina (FOS-Colina-9), ácido dipalmitoil-fosfatídico, caprilato de sodio, y/o ácido ursodesoxicólico.

Los surfactantes **catiónicos** pueden seleccionarse del grupo de: bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadecildimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio, y/o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio.

Los surfactantes **no iónicos** pueden seleccionarse del grupo de BigCHAP, bis(polietilenglicol-bis[imidazoil-carbonilo]), copolímero de bloques tales como copolímero de bloques poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) tales como Poloxamers, Poloxamer 188 y Poloxamer 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremofor® EL, decaetilenglicol-monododeciléter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, alquil-poliglucosidos, aceite de ricino etoxilado, monododeciléter de heptaetilenglicol, monododeciléter de heptaetilenglicol, monotetradeciléter de heptaetilenglicol, monododeciléter de hexaetilenglicol, monohexadeciléter de hexaetilenglicol, monooctadeciléter de hexaetilenglicol, monotetradeciléter de hexaetilenglicol, Igepal CA-630, Igepal CA-630, metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, nonaetilenglicol-monododeciléter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, Octaetilenglicol-monododeciléter, Octaetilenglicolmonododeciléter, Octaetilenglicolmonohexadeciléter, Octaetilenglicolmonooctadeciléter, Octaetilenglicolmonotetradeciléter, Octil-β-D-glucopiranosido, Pentaetilenglicol-monododeciléter, Pentaetilenglicolmonododeciléter, Pentaetilenglicolmonohexadeciléter, Pentaetilenglicolmonohexiléter, Pentaetilenglicolmonooctadeciléter, Pentaetilenglicolmonooctiléter, Polietilenglicoldiglicidiléter, Polietilenglicoléter W-1, Polioxietileno 10 trideciléter, Polioxietileno 100estearato, Polioxietileno 20 isohexadeciléter, Polioxietileno 20 oleiléter, Polioxietileno 40-estearato, Polioxietileno 50estearato, Polioxietileno 8estearato, Polioxietileno bis(imidazoil-carbonilo), Polioxietileno 25 propilenglicol-estearato, Saponina de corteza de Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, Tipo 15-S-12, Tergitol, Tipo 15-S-30, Tergitol, Tipo 15-S-5, Tergitol, Tipo 15-S-7, Tergitol, Tipo 15-S-9, Tergitol, Tipo NP-10, Tergitol, Tipo NP-4, Tergitol, Tipo NP-40, Tergitol, Tipo NP-7, Tergitol, Tipo NP-9, Tetradecil-β-D-maltosido, Tetraetilenglicol-monododeciléter, Tetraetilenglicolmonododeciléter, Tetraetilenglicolmonotetradeciléter, Trietilenglicol-monododeciléter, Trietilenglicolmonododeciléter, Trietilenglicolmonohexadeciléter, Trietilenglicolmonooctiléter, Trietilenglicol-monotetradeciléter, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton® X-100, Triton® X-114, Triton® X-165 solución, Triton® X-305 solución, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos, y/o n-Undecil β-D-glucopiranosido.

Los surfactantes **de ion híbrido** pueden seleccionarse del grupo de CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-Dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-Dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-Dimetiloltilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-Dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alkil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonato, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, Dodecilsulfocolina, miristoil-lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(Decildimetilamonio)propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(Octildimetilamonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidil-serina), gliceroglicolípidos (galactopiranosido), alquilo, alcoilo(alquil-éster), alcoxi(alquil-éter)-derivados de lisofosfatidil- y fosfatidilcolinas, v.g. lauroil- y miristoil-derivados de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^{beta}-acilados de lisina, arginina, o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^{beta}-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^{beta}-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el surfactante puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C₆-C₁₂ (v.g. ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, surfactantes monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil-lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (v.g. 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato-ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina), o mezclas de los mismos.

El término "alquil-poliglucosidos", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una cadena C₅₋₂₀-alquilo, -alquénilo o -alquinilo lineal o ramificada que está sustituida por uno o más restos glucosido tales como maltosido, sacárido, etc. Realizaciones de estos alquil-poliglucosidos incluyen C₆₋₁₈-alquil-poliglucosidos. Realizaciones específicas de estos alquil-poliglucosidos incluyen las cadenas de número par de carbonos tales como cadenas alquílicas C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Realizaciones específicas de los restos glucosídicos incluyen piranosido, glucopiranosido, maltosido, maltotriosido y sacarosa. En algunas realizaciones de la invención, están unidos menos de 6 restos glucosido al grupo alquilo. En algunas realizaciones de la invención, están unidos menos de 5 restos glucosido al grupo alquilo. En algunas realizaciones de la invención están unidos menos de 4 restos glucosido al grupo alquilo. En algunas realizaciones de la invención están unidos menos de 3 restos glucosido al grupo alquilo. En algunas realizaciones de la invención están unidos menos de 2 restos glucosido al grupo alquilo. Realizaciones específicas de alquil-poliglucosidos son alquil-glucosidos tales como n-glicil-β-D-glucopiranosido, decil-β-D-maltopiranosido, dodecil-β-D-glucopiranosido, n-dodecil-β-D-maltosido, n-dodecil-β-D-maltosido, n-dodecil-β-D-maltosido, tetradecil-β-D-glucopiranosido, decil-β-D-maltosido, hexadecil-β-D-maltosido, decil-β-D-maltotriosido, dodecil-β-D-maltotriosido, tetradecil-β-D-maltotriosido, hexadecil-β-D-maltotriosido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa.

El uso de un surfactante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19^a, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente inhibidores de proteasas tales como EDTA (ácido etilenodiamina-tetraacético) y benzamidina.HCl, pero pueden utilizarse también otros inhibidores de proteasas disponibles comercialmente. El uso de un inhibidor de proteasas es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas a fin de inhibir la autocatálisis.

Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de aumento de volumen, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (v.g., seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un ion híbrido (v.g., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar desfavorablemente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto conforme a la presente invención pueden administrarse a un paciente que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de piel y mucosas, en sitios que puentean la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen. La administración de composiciones farmacéuticas conforme a la invención puede realizarse por varias rutas de administración, por ejemplo lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una composición de las mismas, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que se encuentran en necesidad de un tratamiento de este tipo.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas, cremas, emplastos, ungüentos, tabletas, tabletas recubiertas, lavados, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizaciones, polvos, aerosoles, inhalaciones, gotas oftálmicas, ungüentos oftálmicos, lavados oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución, inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo gelificación in situ, deposición in situ, cristalización in situ, solución por infusión, e implantes.

Las composiciones de la invención pueden estar compuestas adicionalmente de, o unidas a, por ejemplo por interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, a un portador de fármaco, sistema de suministro de fármaco y sistema avanzado de suministro de fármaco a fin de mejorar adicionalmente la estabilidad del compuesto de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, reducir los efectos adversos, lograr cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar el acatamiento por el paciente o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de portadores, sistemas de suministro de fármaco y sistemas avanzados de suministro de fármaco incluyen, pero sin carácter limitante, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloques de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas de copolímeros de bloques bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma, bien conocidas por los expertos en la técnica del comportamiento físico en sistemas lípido-agua, micelas polímeras, emulsiones múltiples, auto-emulsificación, auto-microemulsificación, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar de compuestos de la presente invención, utilizando, por ejemplo, un inhalador de dosis medidas, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos los dispositivos citados bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de suministro de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada, y lenta. Más específicamente, pero sin carácter limitante, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación parenteral controlada y sostenida (conduciendo ambos sistemas a una reducción múltiple del número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Aún más preferiblemente, se trata de sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, ejemplos de sistemas y composiciones útiles de liberación controlada son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas de polímeros, microesferas y nanopartículas. Métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para composiciones de la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión o un polvo para la administración del compuesto de la presente invención en la forma de una pulverización nasal o pulmonar, líquida o en polvo. Como otra opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención pueden adaptarse también a administración transdérmica, v.g. por inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosal, v.g. bucal.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco utilizando cualquiera de tipos conocidos de dispositivos adecuados para suministro pulmonar de fármacos. Ejemplos de éstos comprenden, pero sin carácter limitante, los tres tipos generales de generación de aerosoles para administración pulmonar de fármacos, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medidas, o inhaladores de polvo seco (compárese Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basándose en metodología de ensayos estandarizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro geométrico equivalente de una partícula esférica estándar de referencia de densidad unidad (1 g/cm^3). En el caso más simple, para partículas esféricas, d_a se refiere a un diámetro de referencia (d) como función de la raíz cuadrada de la ratio de densidades descrita por:

Modificaciones de esta relación son válidas para partículas no esféricas (compárese Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" están bien descritos y son conocidos en la técnica (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R y representan una medida de del valor mediano de una distribución de tamaños de partículas aerodinámicas. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

El diámetro aerodinámico mediano másico (MMAD) y el diámetro aerodinámico mediano másico efectivo (MMEAD) se utilizan intercambiamente, son parámetros estadísticos, y describen empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol en relación con su potencial para depositarse en los pulmones, con independencia de forma, tamaño, o densidad reales (compárese Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El MMAD se calcula normalmente a partir de la medida realizada con impactadores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de las partículas en el aire.

En una realización adicional, la formulación podría aerosolizarse por cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para lograr un MMAD de partículas de aerosol menores que $10 \mu\text{m}$, más preferiblemente entre 1 y $5 \mu\text{m}$, y muy preferiblemente entre 1 y $3 \mu\text{m}$. El tamaño de partícula preferido está basado en el tamaño más eficaz para suministro de fármaco al pulmón profundo, en el que la proteína es absorbida óptimamente (compárese Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

La dispersión en el pulmón profundo de las formulaciones pulmonares que comprenden el compuesto de la presente invención puede optimizarse opcionalmente aún más utilizando modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero sin carácter limitante de: flujo por inhalación lenta (v.g. 30 L/min), retención de la respiración y sincronización de accionamiento.

5 El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química incrementada, o estabilidad física y química incrementadas.

10 El término "estabilidad física" de la formulación de proteína como se utiliza en esta memoria se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de exposición de la proteína a esfuerzos termomecánicos y/o interacción con interfases y superficies que son desestabilizadoras, tales como superficies e interfases hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína se evalúa por medio de inspección visual y/o medidas de turbidez después de exposición de la formulación llenada en recipientes adecuados (v.g. cartuchos o viales) a esfuerzos mecánico/físicos (v.g. agitación) a temperaturas diferentes durante periodos de tiempo variables. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz enfocada nítidamente con fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por un registro visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no exhibe turbidez alguna corresponde a un registro visual de 0, y una formulación que exhibe turbidez visual en luz diurna corresponde a un registro visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable con respecto a agregación de proteína cuando la misma exhibe turbidez visual en luz diurna. Alternativamente, la turbidez de la formulación puede evaluarse por medidas simples de la turbidez bien conocidas por la persona experta. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína puede evaluarse también usando un agente espectroscópico o sonda del estatus de conformación de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que se fija con preferencia a un conformador no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica de estructura de proteína de molécula pequeña es Tioflavina T. La Tioflavina T es un tinte fluorescente que ha sido utilizado ampliamente para la detección de fibrillas de amiloide. En presencia de fibrillas, y quizás también de otras conformaciones de proteínas, la Tioflavina T da lugar a un máximo de excitación nuevo a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando se fija a una forma de proteína fibrilar. La Tioflavina T no fijada es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

30 Otras moléculas pequeñas pueden utilizarse como sondas de los cambios en la estructura de las proteínas del estado nativo al no nativo. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo" que se fijan preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos están generalmente ocultos en el interior de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos cuando una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas pequeñas sondas espectroscópicas moleculares son tintes aromáticos, hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o análogos. Otras sondas espectroscópicas son complejos metal-aminoácido, tales como complejos de cobalto metálico con aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, y valina, o análogos.

40 El término "estabilidad química" de la formulación de proteína, como se utiliza en esta memoria, se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos químicos de degradación con potencia biológica potencialmente inferior y/o propiedades inmunógenas potencialmente incrementadas comparadas con la estructura de la proteína nativa. Pueden formarse diversos productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y el ambiente al que esté expuesta la proteína. Con gran probabilidad, la eliminación de la degradación química no puede evitarse por completo y cantidades crecientes de productos de degradación química se observan a menudo durante el almacenamiento y uso de la formulación de proteínas como es bien conocido por las personas expertas en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de la cadena lateral en los residuos glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otros caminos de degradación implican la formación de productos de transformación de peso molecular alto en los que dos o más moléculas de proteína están unidas covalentemente unas a otras por transamidación y/o interacciones de disulfuros que conducen a la formación de productos de degradación dímeros, oligómeros y polímeros unidos (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (por ejemplo, de residuos metionina) puede mencionarse como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteínas puede evaluarse por medida de la cantidad de los productos químicos de degradación en diversos momentos después de la exposición a condiciones ambientales diferentes (la formación de productos de degradación puede acelerarse a menudo, por ejemplo por aumento de temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se determina a menudo por separación de los productos de degradación que dependen del tamaño y/o la carga molecular utilizando diversas técnicas cromatográficas (v.g. SEC-HPLC y/o RP-HPLC). Por tanto, como se ha expuesto anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química incrementada, o estabilidad física y química incrementadas. En general, una formulación tiene que ser estable durante el uso y el almacenamiento (en conformidad con las condiciones recomendadas de uso y almacenamiento) hasta que se alcanza la fecha de expiración.

En una realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

5 En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

10 En otra realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto conforme a la invención para la preparación de un medicamento.

15 En una realización, un compuesto conforme a la invención se utiliza para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes Tipo 2, tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes Tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus, enfermedad de arterias coronarias y otros trastornos cardiovasculares, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia y
20 úlceras gástricas.

En otra realización, un compuesto conforme a la invención se utiliza para la preparación de un medicamento para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes Tipo 2.

25 En otra realización, un compuesto conforme a la invención se utiliza para la preparación de un medicamento para disminución de la ingestión de alimentos, disminución de la apoptosis de las células β , aumento de la función de las células β y masa de células β , y/o para restablecimiento de la sensibilidad de la glucosa a las células β .

El tratamiento con un compuesto conforme a la presente invención puede combinarse también con una segunda o
30 más sustancias farmacológicamente activas, v.g. seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes anti-hipertensivos, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasas, antagonistas de glucagón, DPP-IV (dipeptidil-peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicados en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glicogenólisis, moduladores de la absorción de glucosa, compuestos modificadores del metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG-CoA (estatinas), Polipéptidos Inhibidores Gástricos (análogos de GIP), compuestos reductores de la ingestión de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ;
40 colestiramina, colestipol, clofibrato, genfibrozil, lovastatina, pravastatina, sinvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de la ACE (enzima convertidora de las angiotensinas) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatiopril, quinapril y ramipril, bloqueadores de los canales de calcio tales como nifedipino, fenodipino, nicardipino, isradipino, mimodipino, diltiazem y verapamil, y bloqueadores α tales como doxazosina, urapidil, prazosina y trazosina; agonistas de CART (transcriptor regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas PYY, agonistas PYY2, agonistas PYY4, agonistas mixtos PPY2/PPY4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), agonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas CRF PB (proteína de fijación del factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina (agonistas $\beta 3$), agonistas MSH (hormona estimuladora de los melanocitos),
50 antagonistas MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas CCK (colecistoquinina), inhibidores de la reabsorción de serotonina (inhibidores de la reabsorción de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas TRH (hormona liberadora de tirotropina), moduladores UCP2 ó 3 (proteína de desacoplamiento 2 ó 3), agonistas de leptina, agonistas DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasas/amilasas, moduladores RXR (receptor del retinoide X), agonistas TR β ; antagonistas H3 de histamina, agonistas o antagonistas del Polipéptido Inhibidor Gástrico (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina.

60 El tratamiento con un compuesto conforme a esta invención puede completarse también con cirugía - una cirugía que influye en los niveles de glucosa y/o la homeostasis de los lípidos tal como bandas gástricas o derivación gástrica.

Debe entenderse que cualquier combinación adecuada de los compuestos conforme a la invención con uno o más de los compuestos arriba mencionados y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas
65 adicionales se considera que están dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen, que incluyen compuestos de la invención así como compuestos afines.

EJEMPLOS

5

Abreviaturas utilizadas:

- 10 t.a.: temperatura ambiente
 DIPEA: diisopropiletilamina
 H₂O: agua
 CH₃CN: acetonitrilo
 DMF: N,N-dimetilformamida
 HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
 Fmoc: 9-H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilo
 15 Boc: terc-butiloxycarbonilo
 OtBu: terc-butil-éster
 tBu: terc-butilo
 Trt: trifenilmetilo
 Pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
 20 Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
 ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
 Mtt: 4-metiltrilito
 Mmt: 4-metoxitritilo
 DCM: diclorometano
 25 TIS: triisopropilsilano
 TFA: ácido trifluoroacético
 Et₂O: dietiléter
 NMP: 1-metil-pirrolidin-2-ona
 DIPEA: diisopropiletilamina
 30 HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 DIC: diisopropilcarbodiimida

A: Síntesis del péptido unido a resina

35

La resina peptídica protegida se sintetizó conforme a la estrategia Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 en escala de 0,25 milimoles o 1,0 milimoles utilizando los protocolos FastMocUV suministrados por el fabricante, que emplean acoplamientos mediados por HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en NMP (N-metil-pirrolidona), y monitorización UV de la desprotección del grupo protector Fmoc. La resina de partida utilizada para la síntesis de las amidas del péptido GLP-1 era resina Rink-Amida y se utilizó resina Wang o de clorotritilo para los péptidos GLP-1 con un terminal C carboxi. Los derivados de aminoácidos protegidos utilizados eran aminoácidos estándar Fmoc (suministrados, v.g. por Anaspec, o Novabiochem) suministrados en cartuchos previamente pesados adecuados para el sintetizador ABI433A con la excepción de aminoácidos no naturales tales como Fmoc-Aib-OH (ácido Fmoc-aminoisobutírico). El aminoácido N-terminal era Boc protegido en el grupo amino alfa (v.g. se utilizó Boc-His(Boc)OH para péptidos con His en el terminal N). El grupo amino épsilon de la lisina en posición 26 estaba protegido con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la ruta para fijación del resto de fijación de albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede mejorarse en algunos casos por el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que puede escindirse en condiciones ácidas tales como, pero sin carácter limitante, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, puede utilizarse el uso de dipéptidos de pseudoprolina (véase, v.g. el catálogo de Novabiochem 2002/2003 o una versión más moderna, o W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403.

55 Procedimiento para Eliminación de la Protección con ivDde o Dde.

La resina (0,25 milimoles) se puso en un aparato manual de sacudidas/filtración y se trató con 2% de hidracina en N-metil-pirrolidona (20 mL, 2 x 12 min) para eliminación del grupo Dde o ivDde y lavado con N-metil-pirrolidona (4 x 20 mL).

60

Procedimiento para Eliminación de la Protección con Mtt o Mmt.

La resina (0,25 mL) se puso en un aparato manual de sacudidas/filtración y se trató con 2% TFA y 2-3% TIS en DCM (20 mL, 5-10 min repetido 6-12 veces) para eliminación del grupo Mtt o Mmt y lavado con DCM (2 x 20 mL), 10% MeOH y 5% DIPEA en DCM (2 x 20 mL) y N-metil-pirrolidona (4 x 20 mL).

65

Procedimiento para Fijación de Cadenas Laterales al Residuo Lisina.

El residuo de fijación de albúmina (cadena lateral B-U de fórmula I) puede unirse al péptido GLP-1 por acilación al péptido unido a resina o acilación en solución al péptido no protegido utilizando reactivo estándar de acilación tal como, pero sin carácter limitante, DIC, HOBt/DIC, HOAt/DIC, o HBTU.

Fijación al Péptido Unido a Resina.

Ruta I

Un residuo de fijación de albúmina activado (éster activo o anhídrido simétrico) (cadena lateral B-U de fórmula I) tal como mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster del ácido octadecanodioico (Ebashi et al. EP 511600, 4 equivalentes molares con relación al péptido fijado a resina) se disolvió en NMP (25 mL), se añadió a la resina y se agitó mediante sacudidas durante una noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó concienzudamente con NMP, diclorometano, 2-propanol, metanol y dietil-éter.

Ruta II

El residuo de fijación de albúmina (cadena lateral B-U de fórmula I) se disolvió en N-metil-pirrolidona/cloruro de metileno (1:1, 10 mL). Se añadió el reactivo de activación tal como hidroxibenzotriazol (HOBt) (4 equivalentes molares con relación a resina) y diisopropilcarbodiimida (4 equivalentes molares con relación a resina) y la solución se agitó durante 15 min. Se añadió la solución a la resina y se añadió diisopropiletilamina (4 equivalentes molares con relación a resina). La resina se agitó mediante sacudidas 2 a 24 horas a la temperatura ambiente. La resina se lavó con N-metil-pirrolidona (2 x 20 mL), N-metil-pirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 mL) y cloruro de metileno (2 x 20 mL).

Ruta III

Un residuo de fijación de albúmina activado (éster activo o anhídrido simétrico) (cadena lateral B-U- de fórmula I) tal como mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster del ácido octadecanodioico (Ebashi et al. EP 511600, 1-1,5 equivalentes molares con relación al péptido GLP-1) se disolvió en un disolvente orgánico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mezcla de agua/disolvente orgánico (1-2 mL) y se añadió a una solución del péptido en agua (10-20 mL) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de grupos protectores en el residuo de fijación de albúmina tales como terc-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó durante una noche y el péptido bruto aislado se desprotegió después de ello - en el caso de un grupo terc-butilo, el péptido se disolvió en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 min, la mezcla se evaporó a vacío y el péptido final se purificó por HPLC preparativa.

Procedimiento para Eliminación de la Protección Fmoc: La resina (0,25 milimoles) se puso en un matraz de filtración en un aparato manual de agitación mediante sacudidas y se trató con N-metil-pirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 mL) y con N-metil-pirrolidona (1 x 20 mL), una solución de 20% piperidina en N-metil-pirrolidona (3 x 20 mL, 10 min de cada uno). La resina se lavó con N-metil-pirrolidona (2 x 20 mL), N-metil-pirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 mL) y cloruro de metileno (2 x 20 mL).

Procedimiento para Escisión del Péptido de la resina:

El péptido se escindió de la resina por agitación durante 180 min a la temperatura ambiente con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (95:2,5:2,5 a 92:4:4). La mezcla la escisión se filtró y el filtrado se concentró para dar un aceite en corriente de nitrógeno. El péptido bruto se precipitó a partir de este aceite con 45 mL de dietil-éter y se lavó 1 a 3 veces con 45 mL de dietil-éter.

Purificación: el péptido bruto se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 20 mL x 250 mL rellena con sílice C-18 de 5 µ o 7 µ. Dependiendo del péptido, se utilizaron uno o dos sistemas de purificación.

TFA: después del secado, el péptido bruto se disolvió en 5 mL de ácido acético.H₂O al 50% y se diluyó a 20 mL con H₂O y se inyectó en la columna que se eluyó luego con un gradiente de 40-60% CH₃CN en 0,1% TFA 10 mL/min durante 50 min a 40°C. Las fracciones que contenían el péptido se recogieron. El péptido purificado se liofilizó después de dilución del eluato con agua. Sulfato de amonio: La columna se equilibró con 40% CH₃CN en 0,05 M (NH₄)₂SO₄, que se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ concentrado. Después del secado, el péptido bruto se disolvió en 5 mL de ácido acético.H₂O al 50% y se diluyó a 20 mL con H₂O, después de lo cual se inyectó en la columna que se eluyó luego con un gradiente de 40%-60% CH₃CN en 0,05 M (NH₄)₂SO₄, pH 2,5 a 10 mL/min durante 50 min a 40°C. Las fracciones que contenían el péptido se recogieron y se diluyeron con 3 volúmenes de H₂O y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak® C18 (Waters part #: 51910) que se había equilibrado con 0,1% TFA. Se eluyó luego con 70% CH₃CN que contenía 0,1% de TFA y el péptido purificado se aisló por liofilización después de dilución del eluato con agua.

El producto final obtenido se caracterizó por RP-HPLC analítica (tiempo de retención) y por LCMS.

El análisis RP-HPLC se realizó utilizando detección UV a 214 nm y una columna de sílice Vydac 218 TP54 de 4,6 mm x 250 mm de 5 µ (The Separations Group, Hesperia, U.S.) que se eluyó a 1 mL/min a 42°C. Se utilizaron dos condiciones de elución diferentes:

A1: Equilibración de la columna con un tampón constituido por 0,1 M (NH₄)₂SO₄, que se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ concentrado y elución por un gradiente de 0% a 60% CH₃CN en el mismo tampón durante 50 min.

B1: Equilibración de la columna con 0,1% TFA/H₂O y elución por un gradiente de 0% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O a 60% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O durante 50 min.

B6: Equilibración de la columna con 0,1% TFA/H₂O y elución por un gradiente de 0% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O a 90% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O durante 50 min.

Alternativamente, el análisis RP-HPLC se realizó utilizando detección UV a 214 nm y una columna Symmetry 300 de sílice C-18 de 3,6 mm x 150 mm, 3,5 µ (Waters) que se eluyó a 1 ml/min a 42°C.

B4: Equilibración de la columna con 0,05% TFA/H₂O y elución por un gradiente de 5% CH₃CN/0,05% TFA/H₂O a 95% CH₃CN/0,05% TFA/H₂O durante 15 min.

Se utilizó la instrumentación siguiente:

La LCMS se realizó en un montaje constituido por espectrómetro de masas cuadrupolo Sciex API 100 Single, bomba Perkin Elmer Series 200 Quard, tomamuestras automático Perkin Elmer Series 200, detector UV Applied Biosystems 785A, y detector de dispersión de la luz por evaporación Sedex 75.

El control del instrumento y la adquisición de los datos se realizaron por el software de control Sciex Sample ejecutado en una computadora Windows 2000.

La bomba HPLC está conectada a dos depósitos de eluyente que contienen:

A: 0,05% ácido trifluoroacético en agua
B: 0,05% ácido trifluoroacético en acetonitrilo

El análisis se realiza a la temperatura ambiente por inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 20 µl) en la columna que se eluye con un gradiente de acetonitrilo.

Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas utilizados se dan en la tabla siguiente.

Columna:	Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente:	5%-90% lineal acetonitrilo durante 7,5 min a 1,5 ml/min
Detección:	210 nm (salida análoga de DAD)

ELS (salida análoga de ELS), 40°C

Modo de ionización MS, API-ES.

Alternativamente, la LCMS se realizó en un montaje constituido por una Bomba Bin G1312A Hewlett Packard Series 1100, compartimiento de columna Hewlett Packard Series 1100, detector de red de diodos G1315A DAD Hewlett Packard Series 1100, detector de Dispersión de Luz por Evaporación Hewlett Packard Series 1100 MSD y Sedex 75 controlado por software Chemstation HP. La bomba HPLC está conectada a dos depósitos de eluyente que contienen:

A: NH₄OH 10 mM en agua
B: NH₄OH 10 mM en acetonitrilo al 90%

El análisis se realizó a 23°C por inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 20 µL) en la columna que se eluye con un gradiente de A y B.

Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas utilizados se dan en la tabla siguiente.

Columna:	Waters Xterra MS C-18 X 3 mm, di 5 m
Gradiente:	5%-100% lineal acetonitrilo durante 6,5 min a 1,5 ml/min
Detección:	210 nm (salida análoga de DAD)

ELS (salida análoga de ELS).
MS, modo de ionización API-E
S. Escaneo a 100-1000 amu, paso 0,1 amu.

5 Fijación de radioligandos a membranas plasmáticas que expresan el receptor de GLP-1 humano

El ensayo de fijación se realizó con membranas plasmáticas purificadas que contenían el receptor de GLP-1 humano. Las membranas plasmáticas que contenían los receptores se purificaron a partir de células 13 tk-ts que expresaban establemente BHK. Las membranas se diluyeron en Tampón de Ensayo (HEPES 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, 0,005% Tween 20, pH = 7,4) a una concentración final de 0,2 mg/ml de proteína y se distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pocillos previamente recubiertas con 0,3% PEI. Las membranas en presencia de 0,05 nM [¹²⁵I] GLP-1, ligandos sin marcar en concentraciones crecientes y concentraciones diferentes de HSA (0,005%, 0,05%, y 2%) se incubaron 2 horas a 30°C. Después de la incubación, los ligandos no fijados se separaron de los ligandos fijados por filtración a través de un distribuidor de vacío seguido por lavado 2 x 100 µl con tampón de ensayo enfriado en hielo. Los filtros se secaron durante una noche a la temperatura ambiente, se extrajeron y se cuantificaron en un contador γ.

Ejemplo 1



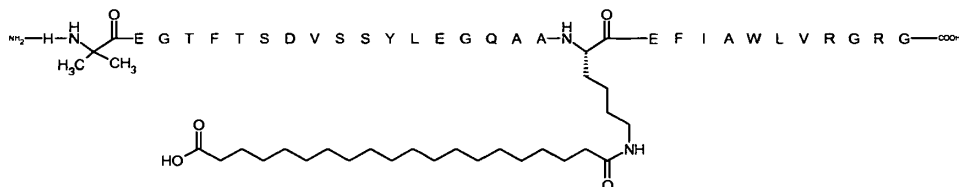
Péptido N-ε²⁶ (17-carboxiheptadecanoyl)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

Se utilizó una resina (Fmoc-Gly-NovaSyn TGT, 0,22 milimol/g Novabiochem, 0,25 milimoles) para producir la secuencia primaria en una máquina ABI433A conforme a las orientaciones del fabricante. Todos los grupos protectores eran lábiles en medio ácido con la excepción del residuo utilizado en posición 26 (FmocLys(ivDde)-OH, Novabiochem) que permitía la desprotección específica de esta lisina en lugar de cualquier otra lisina.

Procedimiento

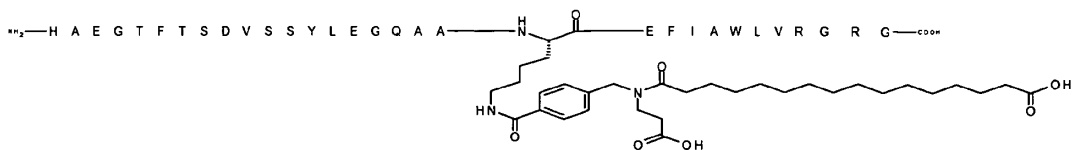
La resina (0,09 milimoles) se puso en un aparato manual de sacudidas/filtración y se trató con hidracina al 4% en N-metil-pirrolidona en (4 x 10 min, 4 x 4 ml) para separar el grupo ivDde. La resina se lavó con N-metil-pirrolidona (3 x 4 ml). Se disolvió mono-(2,5-dioxo-pirrolidona-1-il)-éster de ácido octadecanodioico (4 equivalentes molares con relación a resina) en DMF (4 ml). La solución se añadió a la resina y se añadió diisopropiletilamina (8 equivalentes molares con relación a resina). La resina se agitó mediante sacudidas 24 horas a la temperatura ambiente. La resina se lavó con N-metil-pirrolidona (4 x 4 ml) y DCM (4 x 4 ml). El péptido se escindió de la resina por agitación durante 180 min a la temperatura ambiente con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (92,5:5,0:2,5 4 ml). La mezcla de escisión se filtró y el péptido bruto se precipitó a partir de 40 ml de dietil-éter y se lavó tres veces con 45 ml de dietil-éter. El péptido bruto se purificó por HPLC preparativa en una columna de 20 mm x 250 mm rellena con sílice C-18 de 7 µm. EL péptido bruto se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50% en agua y se diluyó a 20 ml con H₂O y se inyectó en la columna que se eluyó luego con un gradiente de 25-65% (CH₃CN en agua con 0,1% TFA) a 20 ml/min durante 40 min a la temperatura ambiente. Se recogieron las fracciones que contenían el péptido. El péptido purificado se liofilizó después de dilución del eluato con agua.
HPLC (método B4): Tiempo de retención = 9,94 min (91%).
LCMS: m/z = 1232 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1232.

Ejemplo 2



Péptido N-ω²⁶ (19-carboxinonadecanoyl)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

Preparado como en el Ejemplo 1 y de acuerdo con "métodos de síntesis".
HPLC (método B4): Tiempo de retención = 10,42 min (91%).
LCMS: m/z = 1242 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1242.

Ejemplo 3

5 Péptido N-ε²⁶-(4-[[N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil]benzoil[Arg34]GLP-1-(7-37)

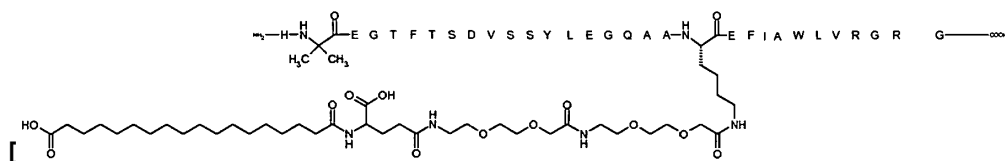
A una solución de ácido 4-(N-(2-(*terc*-butoxicarbonil)etil)-N-(15-(*terc*-butoxicarbonil)pentadecanoil)aminometil)-benzoico (36 mg, 60 μmol) en THF (1 ml) se añadieron DIPEA (7 μl) y hexafluorofosfato de O-(1-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU, 17 mg, 56 μl). Después de agitar durante 1 hora a la temperatura ambiente, la mixtura se diluyó con THF (1 ml), y se añadió 1 ml de la solución resultante a una solución de péptido [Arg34] GLP-1-(7-37) (aproximadamente 100 mg) y DIPEA (103 μl) en agua (5 ml). Después de 0,5 horas, se añadió más cantidad de la solución en THF de agente de acilación (0,4 ml). Después de agitar a la temperatura ambiente durante un total de 1,5 horas, la mixtura de reacción se filtró y se aplicó a una HPLC preparativa (elución en gradiente con 35-55% MeCN/55-35% agua/10% agua con 1% TFA). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y liofilizaron. El producto se trató luego con 25 ml de una mixtura de TFA y agua (95/5 vol) durante 15 min a la temperatura ambiente, se concentró, y se purificó una vez más por HPLC. Se obtuvieron 15,4 mg del compuesto del título.

HPLC (método B4): Tiempo de retención = 9,41 min (99%).

LCMS: m/z = 1287 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1287.

Ejemplo 4

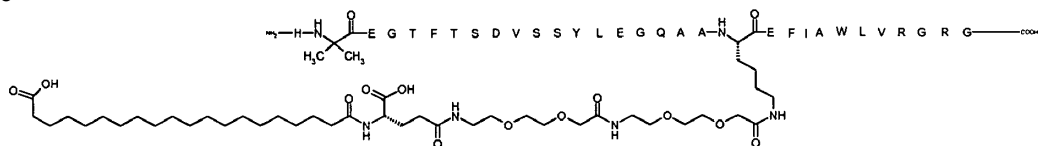
Péptido N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]-acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)



Se preparó el péptido [Aib8, Arg34] GLP-1-(7-37) por síntesis estándar de péptidos en fase sólida con Fmoc y se purificó por HPLC preparativa. Se disolvió el péptido [Aib8, Arg34] GLP-1-(7-37) en agua (15 ml) y se añadió DIPEA (50 μl). Se disolvió éster *terc*-butilico del ácido 17-((S)-1-*terc*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxipirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)etoxi]etilcarbamoil}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (21 mg) en acetonitrilo/agua 2:1 (1,5 ml) y se añadió en pequeñas porciones. La reacción se monitorizó por HPLC. Cuando ya no se encontraba más péptido [Aib8, Arg34] GLP-1-(7-37) la mixtura de reacción se liofilizó durante una noche. Se añadieron al compuesto aislado 10 ml de 90% TFA/5% TIS/5% agua y la mixtura de reacción se dejó en reposo durante 2 horas, se evaporó a vacío, y se co-evaporó con heptano. El aceite residual se disolvió en 15 ml de agua que contenía 1% de NH₃-aq y se purificó por HPLC preparativa para dar el compuesto del título.

HPLC (método B4): Tiempo de retención = 9,60 min (100%).

LCMS: m/z = 1372 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1372.

Ejemplo 5

Péptido N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(19-carboxionadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

El péptido se preparó conforme a: A. Síntesis del péptido fijado a resina en escala de 0,25 milimoles sobre una resina Fmoc-Gly-Wang (0,66 milimoles/g Novabiochem) para producir la secuencia primaria en una máquina ABI433A conforme a las orientaciones de los fabricantes. Todos los grupos protectores eran lábiles en medio ácido con la excepción del residuo utilizado en posición 26 (FmocLys(Mtt)-OH, Novabiochem) que es superlábil en medio ácido, permitiendo la desprotección específica de esta lisina en lugar de cualquier otra lisina.

Procedimiento para eliminación de la protección Mtt. La resina (0,25 milimoles) se puso en un aparato manual de sacudidas/filtración y se trató con 2% TFA, 3% TIS en DCM (20 ml, 5-10 min, repetido 6-12 veces) para eliminar el grupo Mtt y lavar DMF. La síntesis se continuó con el Procedimiento para fijación de cadenas laterales a residuo

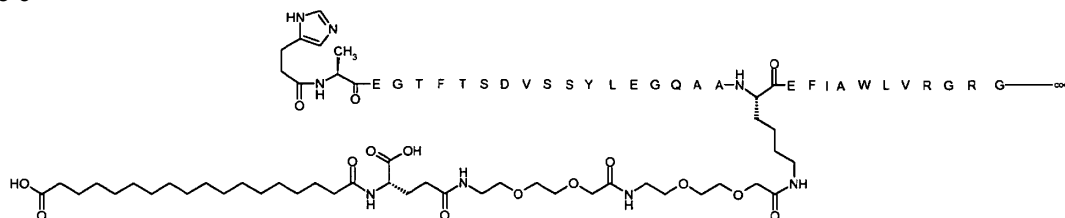
Lisina, siguiendo la Ruta II, con el Procedimiento apropiado para eliminación de la protección Fmoc. Desprotección final, purificación por HPLC y análisis por HPLC y LC-MS conforme a los procedimientos.

HPLC (método B6): Tiempo de retención = 34,56 min (100%).

LCMS: m/z = 1381,8 (MH_3^{3+}). Calculado para ($M+H^+$) = 4142,7.

5

Ejemplo 6



N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[3-(4-Imidazolil)Propionil7,Arg34]GLP-1-(7-37)Péptido

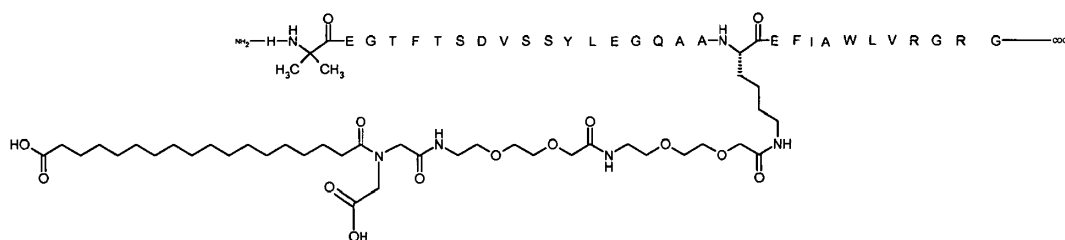
10

Preparado como en Ejemplo 5 y de acuerdo con "métodos de síntesis".

HPLC (método B6): Tiempo de retención = 32,89 min (100%).

LCMS: m/z = 1362,3 (MH_3^{3+}). Calculado para ($M+H^+$) = 4085,6.

15 Ejemplo 7



Péptido N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-(Carboximetil-amino)acetilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

20

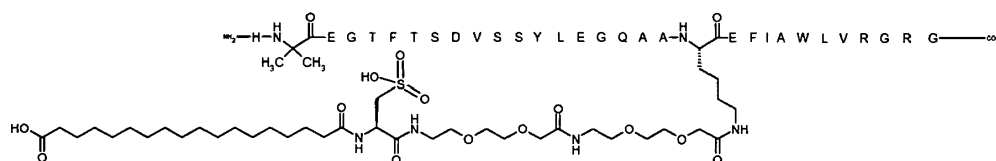
Preparado como en Ejemplo 5 y de acuerdo con "métodos de síntesis".

HPLC (método B6): Tiempo de retención = 32,67 min (100%).

LCMS: m/z = 1367,3 (MH_3^{3+}). Calculado para ($M+H^+$) = 4100,6.

25

Ejemplo 8



Péptido N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-3(S)-Sulfopropionilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

30

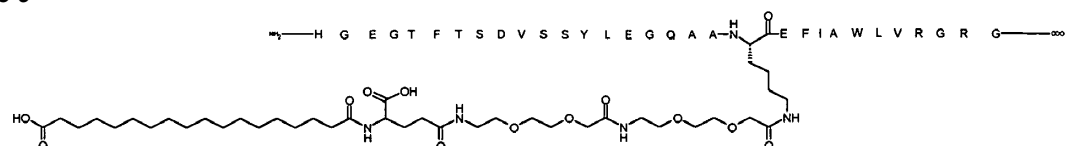
Preparado como en Ejemplo 5 y de acuerdo con "métodos de síntesis".

HPLC (método B6): Tiempo de retención = 32,04 min (100%).

LCMS: m/z = 1379,8 (MH_3^{3+}). Calculado para ($M+H^+$) = 4136,7.

35

Ejemplo 9



Péptido N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)

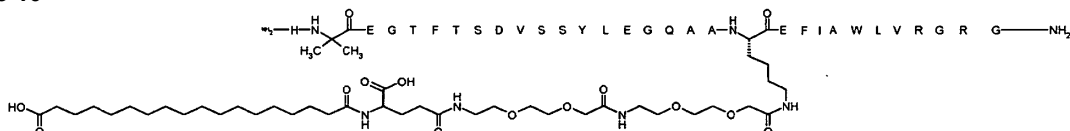
40

Se preparó el péptido [Gly8, Arg34] GLP-1 (7-37) a partir de 150 mg de resina cloruro de 2-clorotritilo (1,4 milimol/g) por síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc utilizando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo Lys en la posición 26 se protegió como Lys(ivDde) mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar lábiles en medio ácido. El residuo Lys se desprotegió con 3% hidracina/3% piperidina en NMP durante 1 hora. A continuación, las dos unidades de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, ácido γ -glutámico y ácido octadecanodioico se acoplaron al péptido fijado a la resina utilizando DIC/HOAt. El péptido se desprotegió finalmente y se escindió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). El péptido se aisló por LC-MS.

HPLC: se eluye en acetonitrilo al 46%

MALDI: 4087 (MH⁺).

Ejemplo 10



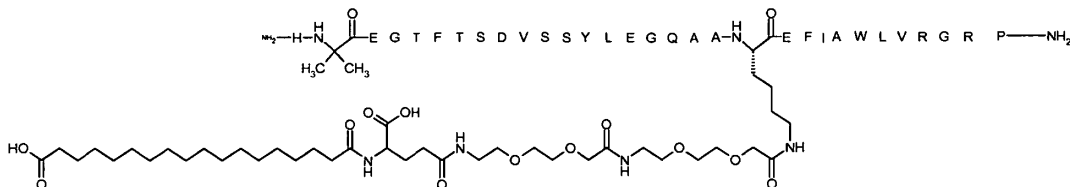
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]-etoxi)acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-amida

Se preparó la amida [Aib8,34] GLP-1 (3-37) a partir de 200 mg de resina S Tentagel RAM (0,26 milimol/g) por síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc utilizando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo Lys en posición 26 se protegió como Lys(ivDde) mientras que las cadenas laterales para los otros aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar lábiles en medio ácido. El residuo Lys se desprotegió con 3% hidracina/3% piperidina en NMP durante 1 hora. A continuación, las dos unidades de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, ácido γ -glutámico y ácido octadecanodioico se acoplaron al péptido fijado a la resina utilizando DIC/HOAt. El péptido se desprotegió finalmente y se escindió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioa (90/5/3/2). El péptido se aisló por LC-MS.

HPLC: Se eluye en acetonitrilo al 49%

MALDI: 4114 (MH⁺).

Ejemplo 11



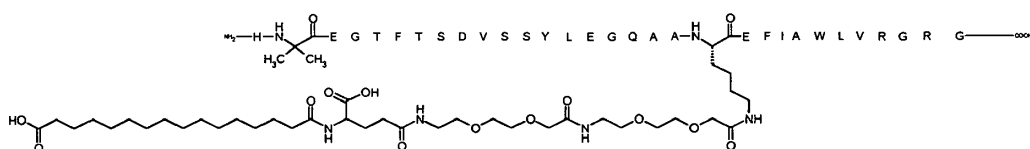
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]-etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Arg34,Pro37]GLP-1-(7-37)amida

El péptido se preparó sobre una resina de amida Rink (0,70 milimoles/g Novabiochem) y por lo demás como en el Ejemplo 5 y de acuerdo con "métodos de síntesis".

HPLC (Método B6): Tiempo de retención = 32.13 min (100%). (Método A1): Tiempo de retención = 44.33 min (98.4%)

LCMS: m/z = 1385.3 (MH₃³⁺). Calculado para (M+H⁺): 4153.8

Ejemplo 12

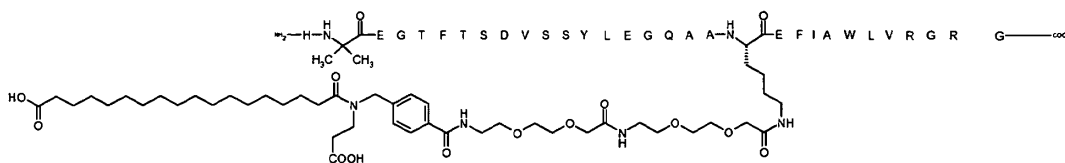


Aib⁸,Lys²⁶(N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(pentadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetil)etoxi]-etoxi)-etoxi)acetil)),Arg³⁴)GLP-1H(7-37)-OH

HPLC (Método B6): Tiempo de retención= 30.41 min

LCMS: m/z = 1362.9 (MH₃³⁺). Calculado para (M⁺) = 4085.61

Ejemplo 13



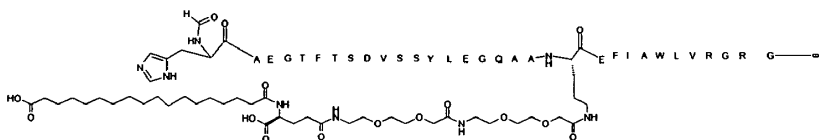
N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{[N-(2-Carboxiethyl)-N-(17-carboxiheptadecanoyl)amino]metil}benzoi)amino]etoxi)-etoxi]-acetilamino]etoxi]etoxi]acetil][Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)

Se preparó un péptido [Aib8,Arg34] GLP-1 (7-37) a partir de 150 mg de resina cloruro de 2-clorotritilo (1,4 milimoles/g) por síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc utilizando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo Lys en posición 26 se protegió como Lys(ivDde) mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar lábiles en medio ácido. El residuo Lys se desprotegió con 3% hidracina/3% piperidina en NMP durante 1 hora. Las dos unidades de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico y ácido 4-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-metil-benzoico se acoplaron al péptido fijado a la resina utilizando DIC-HOAt. El péptido se desprotegió finalmente y se escindió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioanisol 90/5/3/2. El péptido se aisló por LC-MS preparativa.

HPLC: Se eluye en acetonitrilo al 52%.

MALDI: 4191 (MH⁺).

Ejemplo 14

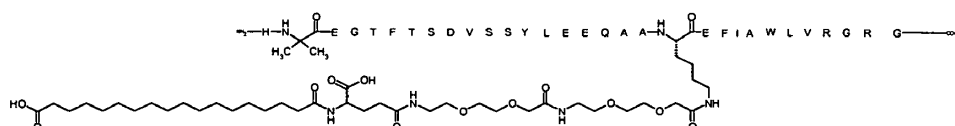


Péptido N- α^7 -formil,N- ϵ^{26} -[2-[2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Arg³⁴]GLP-1-(7-37)

HPLC (Método B6): Tiempo de retención= 32,6 min

LCMS: $m/z = 1377.3$ (MH_3^{3+}) Calculado para (M^+) = 4128.0

Ejemplo 15



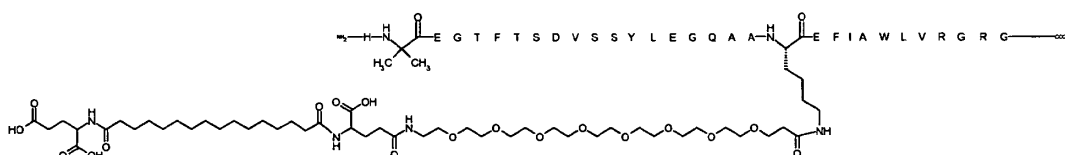
Péptido N- ϵ^{26} 26-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil]]Aib8.Glu22.Arg34]GL P-1-(7-37)

Se preparó un péptido [Aib8, Glu22, Arg34] GLP-1 (7-37) a partir de 150 mg de resina Fmoc-Gly-Wang (0,66 milimoles/g) por síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc utilizando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo Lys en posición 26 se protegió como Lys(Mtt), mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar lábiles en medio ácido. El residuo Lys se desprotegió con 2% TFA/2% TIS en DCM durante 4 x 5 min. Las dos unidades de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, γ -glutámico y éster terc-butílico de ácido octadecanoico se acoplaron al péptido fijado a la resina utilizando DIC/HOAt. El péptido se desprotegió finalmente y se escindió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioanisol 90/5/3/2. El péptido se aisló por LC-MS.

HPLC: Se eluye para acetonitrilo al 50%

MALDI: 4187 (MH+)

Example 16



Péptido N- ϵ^{26} {3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(15-(N-((S)-1,3-dicarboxipropil)carbamoil)pentadecanoilamino)-(S)-4-carboxi-butiril-amino]etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi]propionil}[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

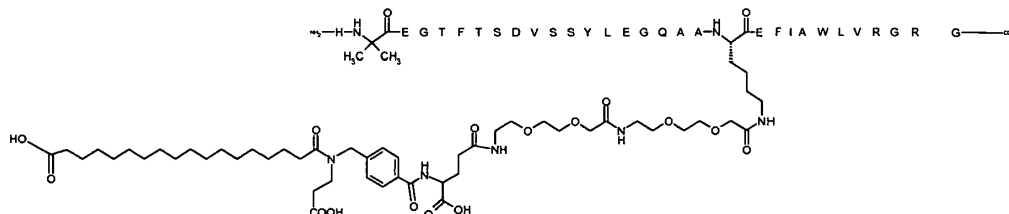
Método y análisis

Preparado como en Ejemplo 3 y conforme a "métodos de síntesis".

5 HPLC (método B4): Tiempo de retención = 10,29 min (92%).

LCMS: m/z = 1450 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}) = 1450.

Ejemplo 17



10 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(4-[[N-(2-Carboxietil)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metil)benzoil)amino](4(S)-carboxi-butirilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

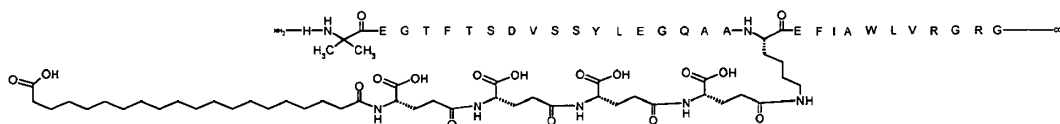
15 Se preparó un péptido [Aib8, Arg34] GLP-1 (7-37) a partir de 150 mg de resina Fmoc-Gly-Wang (0,66 milimoles/g) por síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc utilizando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo Lys en posición 26 se protegió como Lys(Mtt) mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar lábiles en medio ácido. El residuo Lys se desprotegió con 2% TFA/2% TIS en DCM durante 4 x 5 min. Las dos unidades de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, ácido γ -glutámico y ácido 4-[[2-(terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-metil]-benzoico se acoplaron al péptido

20 fijado a la resina utilizando DIC-HOAt. El péptido se desprotegió finalmente y se escindió de la resina con TFA/TIS/ H_2O /tioanisol 90/5/3/2. El péptido se aisló por HPLC preparativa.

HPLC: Se eluye en acetonitrilo al 51%.

25 MALDI: 4320 (MH^+).

Ejemplo 18



30 N- ϵ^{26} -((S)-4-Carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril-amino)butirilamino)butirilamino)butirilamino)[Aib8,Arg 34]GLP-1-(7-37)

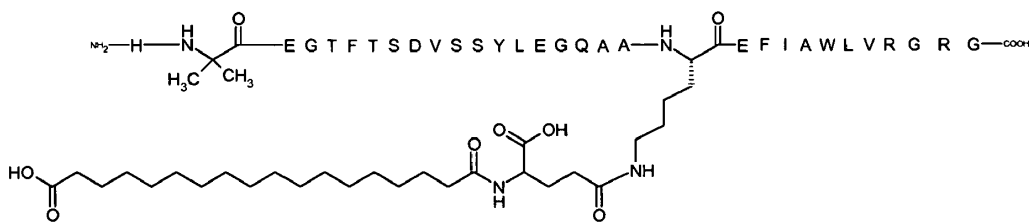
El péptido se sintetizó utilizando química de Fmoc en un Sintetizador de Péptidos Liberty Microwave (CEM Corporation). La síntesis se realizó sobre una lisina Gly-Wang (Novabiochem) con una carga de 0,66 milimoles/g utilizando un exceso de 4 veces de aminoácidos y DIC/HOAt para acoplamiento. La histidina N-terminal se protegió con Boc y la lisina a modificar se protegió con Mtt. Después de la síntesis de la cadena principal del péptido, el grupo Mtt se separó con TFA al 3% en DCM y la cadena lateral se construyó en el instrumento Liberty utilizando protocolos de síntesis estándar de péptidos. En el último paso, se añadió el diácido graso como un mono-t-butiléster.

40 Después de escisión con TFA/TIS/agua (95:2,5:2,5), el péptido se disolvió en acetonitrilo al 50% por adición de DIPEA y se purificó en un sistema Waters LC-MS utilizando una columna de 10 μm C-18 de 7,8 x 300 mm Xterra Prep MS que operaba a la temperatura ambiente. Después de 5 minutos en CH_3CN al 30%, con 0,08% de TFA, 4 ml/min, la columna se eluyó con un gradiente lineal de CH_3CN al 30 a 70% durante 40 minutos. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se recogieron y la concentración del péptido en el eluato se determinó por medida de la absorción UV a 280 nm, suponiendo coeficientes de extinción molar de 1280 y 3690 para tirosina y triptófano respectivamente. La identidad y la pureza se confirmaron por MALDI. Después de la determinación de la concentración, se dividió el eluato en partes alícuotas que se introdujeron en viales que contenían la cantidad deseada y se secaron por centrifugación a vacío.

45 HPLC: Se eluye en acetonitrilo al 52%.

50 MALDI: 4239 (MH^+).

Ejemplo 19



Péptido N-ε²⁶-4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutiril-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

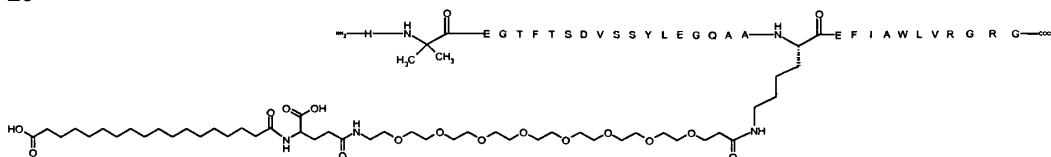
Método y análisis

Preparado como en Ejemplo 4 y conforme a "métodos de síntesis".

5 HPLC (método B4): Tiempo de retención = 9,64 min (97%).

LCMS: m/z = 1276 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1276.

Ejemplo 20

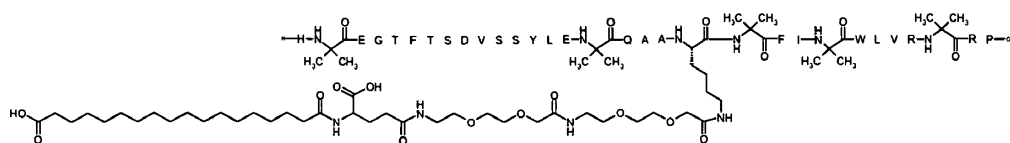


10 Péptido N-ε²⁶-{3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]etoxi)-etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil}[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

LCMS*: m/z = 1417 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺) = 1417.

15 * HPLC (eluida a 0,5 ml/min a 42°C por un gradiente lineal de 5 → 80% acetonitrilo, 85 → 10% agua y 10% de una solución de ácido trifluoroacético al 1,0% durante 50 min. Detección UV a 214 en una columna de sílice C-18 Symmetry 300, 5 μm, 3,9 μm x 150 mm). (Método B4): Tiempo de retención = 32,09 min (95%).

Ejemplo 21

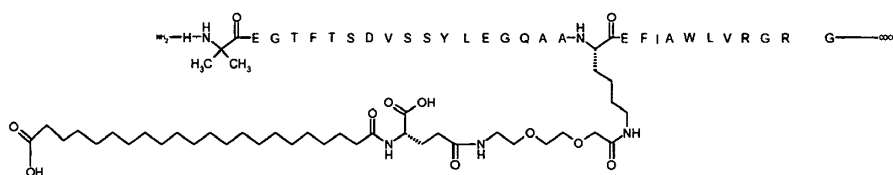


20 N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetil)etoxi)-etoxi]acetil)-[Aib^{8,22,27,30,35},Arg³⁴,Pro³⁷,Lys²⁶]GLP-1(7-37)amida

LCMS: m/z = 1394,0 (MH₃³⁺). Calculado para (M⁺) = 4180,0.

25

Ejemplo 22



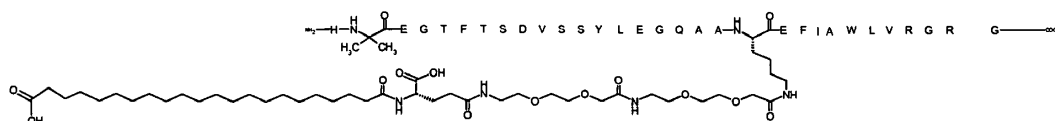
30 N-ε²⁶-[2-(2-[2-[4-(21-Carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

Preparado utilizando el mismo método que en el Ejemplo 19.

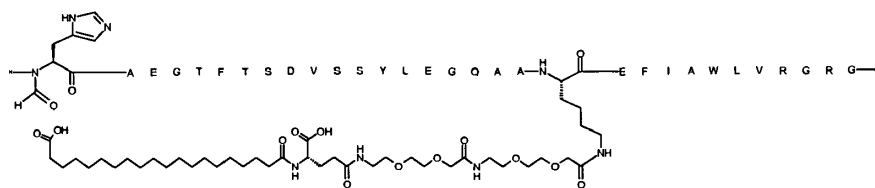
HPLC: Se eluye at 53.4% acetonitrilo

MALDI: 4025 (MH⁺)

35 Otros compuestos de esta invención y compuestos afines incluyen:

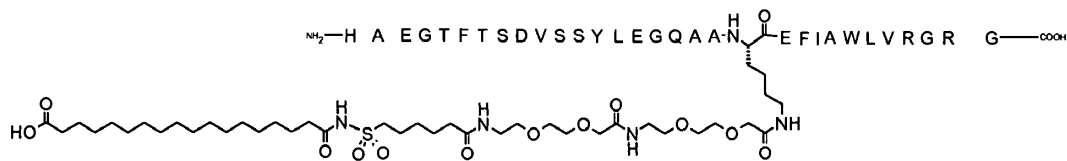
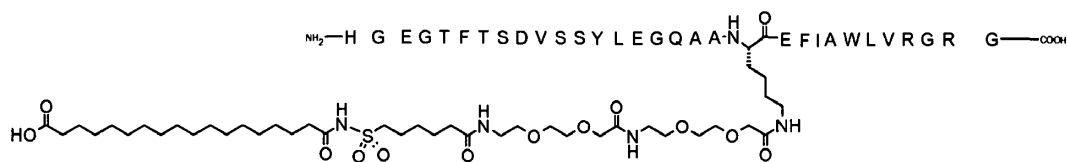
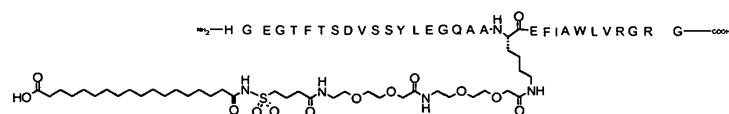
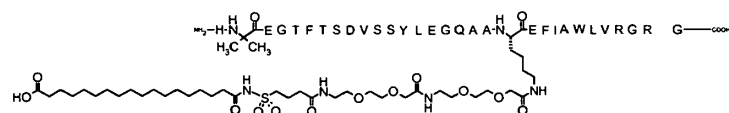
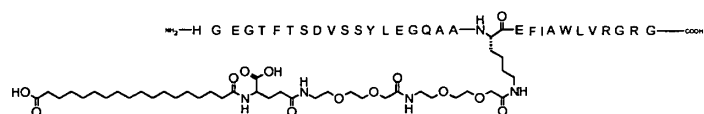
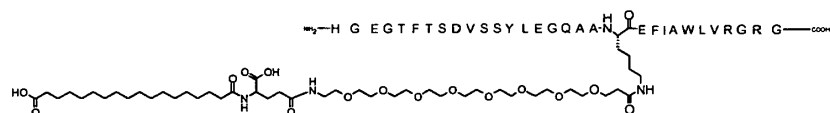
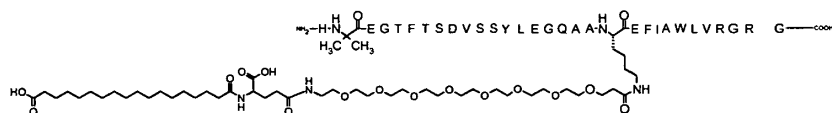
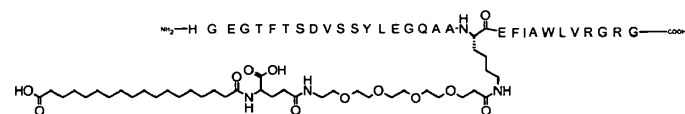
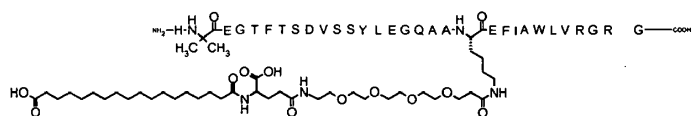


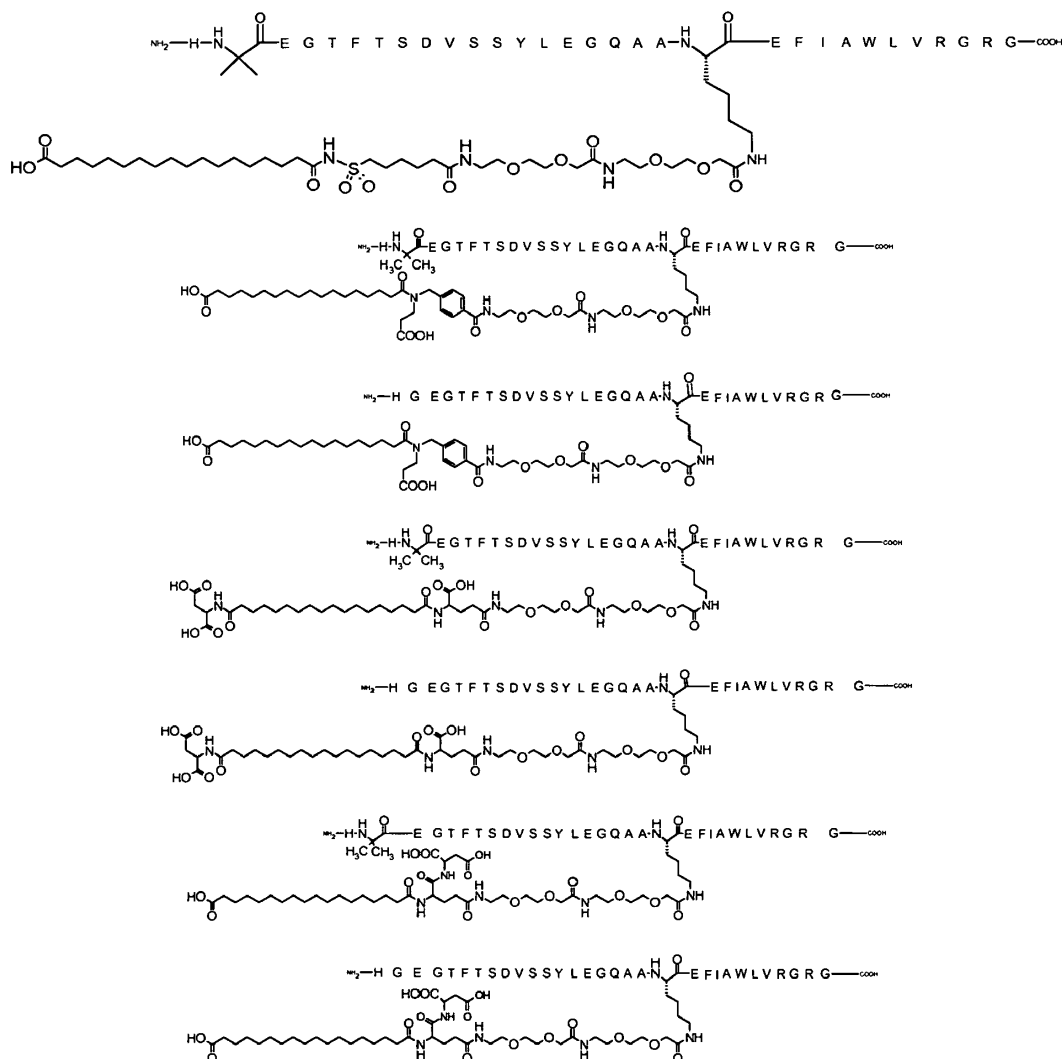
40 Péptido N-ε²⁶-[2-(2-[2-[2-(2-[4-(21-Carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)



Péptido N- α 1-formil-N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-Carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37)

5





5

10

15 *Estudio farmacodinámico utilizando ratones db/db*

En un aspecto de esta invención, los agonistas de GLP-1 tienen una duración de acción de al menos 24 horas después de dosificación de 30 nmol/kg a ratones db/db.

20 La eficacia y duración de acción se miden en ratones db/db.

Ratones db/db macho se envían desde Taconic, Dinamarca, a la edad de 8-10 semanas. Desde el momento de la llegada, los ratones se alojan en condiciones estándar pero a 24°C. Los ratones se mantienen a razón de 10 por jaula hasta la experimentación con acceso libre a comida estándar (Altromin, Brogaarden APS., Dinamarca) y agua del grifo en un día normal: ciclo de luz (luces encendidas a las 6 de la mañana). Los ratones se utilizan para un solo experimento por semana durante 3 semanas. Después de esto, los ratones se sacrifican por eutanasia.

25

Después de un periodo de aclimatación de una semana, se mide la glucosa en sangre por toma de muestras del capilar de la punta de la cola. Resumidamente, se toman muestras de 5 µl de sangre en tubos capilares de vidrio heparinizados y se suspenden inmediatamente en 250 µl de solución tampón EBIO (Eppendorf, Alemania) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. La concentración de glucosa en sangre se mide por el método de la glucosa-oxidasa en el analizador EBIO Plus Auto (Eppendorf, Alemania).

30

El punto de corte del valor para glucosa en sangre es 10 mM. Cuando se evalúan los ratones, es esencial que la totalidad de los 42 ratones que intervienen en el experimento tengan valores de glucosa en sangre por encima de 10 mM, pero también que la varianza inter-ratones sea pequeña. Para ello, si muchos ratones no son severamente diabéticos, en tanto que algunos sí lo son, el comienzo de los experimentos debe posponerse una semana y realizarse nuevas medidas basales de glucosa en sangre.

35

Basándose en los valores basales de glucosa en sangre, se asignan los ratones a 7 grupos de $n = 6$ con valores medios de glucosa en sangre coincidentes por grupo.

El día del test, se evalúan los valores basales matinales de glucosa en sangre como se ha descrito arriba y se evalúa el peso corporal basal de cada ratón. En el tiempo 0, el compuesto se dosifica subcutáneamente en el cogote (volumen de dosificación aproximadamente 350 μ l/50 g ratón). Los valores de glucosa en sangre se siguen hasta las 48 horas (tiempos 1, 3, 6, 24 y 48 h) y se evalúa el peso corporal terminal.

Todos los datos se introducen en Graphpad Prism, donde se calculan la glucosa media en sangre y los pesos corporales delta medios.

Un aspecto de esta invención es la preparación de análogos/derivados de GLP-1 con semividas en plasma prolongadas que son adecuados para administración una vez a la semana. Las propiedades farmacocinéticas pueden evaluarse en lechones o cerdos domésticos como se describe más adelante.

Cribado farmacocinético de análogos de GLP-1 una vez a la semana

Se realizaron cribados farmacocinéticos de análogos de GLP-1 para identificación de candidatos adecuados una vez a la semana sobre candidatos que, conforme al plan de cribado proyectado, se demostró que eran suficientemente potentes con respecto a potencial de disminución de glucosa en un modelo de ratón diabético (ratones db/db) y tenían subsiguientemente un tiempo de duración de 48 horas o más en el modelo de los ratones db/db.

Cribado primario

La primera parte del cribado farmacocinético consistía en una administración subcutánea de una sola dosis de 2 nmol/kg a 3 lechones que pesaban 8-12 kg. Se extrajeron muestras de sangre de cada animal antes de la dosificación y 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección. Todas las muestras de sangre se estabilizaron con un tampón de estabilización especial constituido por: EDTA (disódico) 0,18 M, Aprotinina 15.000 KIE/ml, Val-Pyr 0,30 mM, pH ajustado a 7,4 a fin de prevenir la degradación enzimática de los análogos de GLP-1. Se recogió plasma de todas y cada una de las muestras de sangre estabilizadas por centrifugación (4°C, 10 min., 1270 G (4000 rpm), y se analizó respecto al contenido de análogo de GLP-1 por ensayos ELISA. Se utilizaron 3 ensayos ELISA diferentes para el análisis del plasma: El "ensayo total" utilizando la combinación de anticuerpos F1/Ra2135 que detectaba tanto la molécula 7-37 GLP-1 intacta en el terminal N como la molécula 9-37 GLP-1 degradada enzimáticamente en el terminal N con un límite de detección (LOD) de 35 pM y un intervalo analítico dinámico de 35-30.000 pM. El "ensayo intacto" utilizando la combinación de anticuerpos F1/Mab 26.1. Este ensayo detectaba únicamente la molécula 7-37 GLP-1 intacta en el terminal N. El LOD era 35 pM y un intervalo analítico dinámico de 35-30.000 pM. El "ensayo Aib-intacto" utilizando la combinación de anticuerpos F1/GLP162-3F15. Este ensayo detectaba el terminal N estabilizado con Aib de la molécula GLP-1 que permitía la detección de análogos de GLP-1 estabilizados. El LOD era 45 pM y el intervalo analítico dinámico 45-30.000 pM.

Todos los perfiles concentración-tiempo en plasma se analizaron farmacocinéticamente por un análisis no-compartimental. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos siguientes si los datos lo permitían: t_{max} , C_{max} , AUC, AUC/Dosis₀, AUC%_{Extrapol}, λ_z , $t_{1/2}$, CL/F, V_z/F y MRT.

Cribado secundario

Se condujo una segunda parte del cribado farmacocinético sobre aquellos compuestos que tenían una semivida terminal inicial de 60-70 horas o más. Este cribado consistía en una sola dosis intravenosa y administración subcutánea de 2 nmol/kg a 6 lechones por cada vía de administración. El protocolo de toma de muestras de sangre se prolongó desde 0-120 horas a 0-432 y 0-504 horas después de la administración intravenosa y subcutánea respectivamente. Esto se hizo a fin de aumentar la precisión y exactitud de las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos, especialmente la semivida terminal, AUC y el aclaramiento de los parámetros derivados y volumen de distribución, así como para estimar la biodisponibilidad después de administración subcutánea.

Ensayo de GLP-1 (Aib8-intacto)

El ensayo era un ensayo de dos sitios con incubación simultánea del analito con anticuerpo de captura y anticuerpo detector. Se utilizó un sustrato quimioluminiscente fácil de utilizar para maximizar la señal. El ensayo no reconoce GLP-1 (7-37) endógeno ni el GLP-1 (9-37) escindido con DPPIV.

Plasma de referencia para los ensayos de GLP-1

Se preparó plasma 0 a partir de plasma agrupado con EDTA sin Valina, Pirrolidina y Aprotinina procedente de animales mantenidos en ayunas. El plasma agrupado con EDTA se incubó a 37°C durante 4 horas para eliminar las trazas de GLP-1, y se añadieron después de la incubación Valina, Pirrolidina y Aprotinina.

Tampones

Tampón de recubrimiento.

Se utilizó PBS como tampón de recubrimiento: fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 145 mM ajustado a pH 7,4.

5 Tampón de lavado

PBS con 0,05% (v/v) Tween 20

Tampón de ensayo

PBS con 0,05% (v/v) Tween 20, 10 g/L BSA y 10 mg/L anti-TNP.

Tampón de estreptavidina

10 Tampón de lavado con NaCl 0,5 M adicional.

Sustrato

Sustrato SuperSignal ELISA Femto fácil de utilizar (Pierce, número de catálogo 37075).

15

Estándares

Los estándares se prepararon a partir de una solución stock 25 µM de 0113-0000-0217. El péptido se diluyó en serie en plasma de referencia para preparar estándares con concentraciones finales de 30.000-10.000-3333-1111-370-123-41 y 0 pM. Los estándares se guardaron en tubos Micronic en partes alícuotas de 100 µL a -20°C.

20

Procedimiento de ensayo

Se recubrieron Microplacas Crystal 2000 (negras) con anticuerpo monoclonal GLPb1-7F1, 100 µL de 5 µg/mL en PBS durante una noche a 4°C.

25

Las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado en un lavador de placas automático (SkanWasher, Skatron) y se dejaron en reposo durante al menos 30 min con tampón de lavado para bloquear los sitios restantes.

30

Se añadieron inmediatamente después 20 µL de muestra o estándar a cada pocillo por duplicado, seguido por 100 µL de GLP 162-3F15 biotinilado, 1 µg/mL en tampón de ensayo. Las placas se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente en un aparato de sacudidas de placas seguido por 5 ciclos de lavado como se ha descrito previamente.

35

Se añadieron 100 µL de solución estreptavidina-peroxidasa (KPL, código 14-30-00, 1:20.000 en tampón de estreptavidina) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente en un aparato de sacudidas de placas. Las placas se lavaron como se ha descrito previamente y, después de vaciarlas, se añadieron 100 µL de SuperSignal Femto. Las placas se pusieron en un aparato de sacudidas durante 1 minuto y se midieron en un Luminómetro Orion (Berthold). Los datos se transfirieron a MultiCalc y se calcularon las curvas estándar utilizando el método 4PL ponderado. Las concentraciones de muestra se calcularon a partir de la curva estándar.

40

ENSAYO DE GLP-1 (TOTAL)

El ensayo era un ensayo de dos sitios con incubación simultánea del analito con anticuerpos de captura y de detección. El ensayo reconoce GLP-1 escindido en posición N-terminal hasta GLP-1 (12-37).

45

Tampones

Tampón de recubrimiento

Se utilizó PBS como tampón de recubrimiento: fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 145 mM ajustado a pH 7,4.

50

Tampón de lavado

PBS con 0,05% (v/v) Tween 20

55

Tampón de ensayo

PBS con 0,05% (v/v) Tween 20, 10 g/L BSA y 10 mg/L anti-TNP.

60

Tampón de estreptavidina

Tampón de lavado con NaCl 0,5 M adicional.

Sustrato

65

Sustrato TMB fácil de utilizar (KemEnTec, código 4380A).

Tampón de parada

5 H₃PO₄ 4 M.

Estándares

10 Los estándares se prepararon a partir de una solución stock 25 µM de 0113-0000-0217. El péptido se diluyó en serie en plasma de referencia para preparar estándares con concentraciones finales de 30.000-10.000-3333-1111-370-123-41 y 0 pM. Los estándares se guardaron en tubos Micronic en partes alícuotas de 100 µL a -20°C.

Procedimiento de ensayo

15 Se recubrieron placas de microtitulación Maxisorp (NUNC) con anticuerpo monoclonal GLPb1-7F1, 100 µL de 5 µg/mL en PBS durante una noche a 4°C.

20 Las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado en un lavador de placas automático (SkanWasher, Skatron) y se dejaron en reposo durante al menos 30 min con tampón de lavado para bloquear los sitios restantes.

Se añadieron inmediatamente después a cada pocillo 20 µL de muestra o estándar seguidos por 100 µL de Ra2135-biotinilado, 1 µg/mL en tampón de ensayo. Las placas se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente en un aparato de sacudidas de placas seguido por 5 ciclos de lavado como se ha descrito previamente.

25 Se añadieron 100 µL de solución estreptavidina-peroxidasa (Amersham Biosciences, código RPN4441V, 1:8000 en tampón de ensayo) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente en un aparato de sacudidas de placas. Las placas se lavaron como se ha descrito previamente y, después de vaciarlas, se añadieron 100 µL de TMB y, después de 5 min, se paró con 100 µL de H₃PO₄.

30 Las placas se midieron en un Lector Victor Multilabel (Wallac). Se transfirieron los datos a MultiCalc y se calcularon las curvas estándar utilizando el método 4PM ponderado. Las concentraciones de las muestras se calcularon a partir de la curva estándar.

35 Los procedimientos experimentales in vivo, el análisis del plasma y el análisis farmacocinético fueron idénticos a lo descrito bajo el cribado primario.

Formulación farmacéutica:

Un compuesto de la invención puede formularse como:

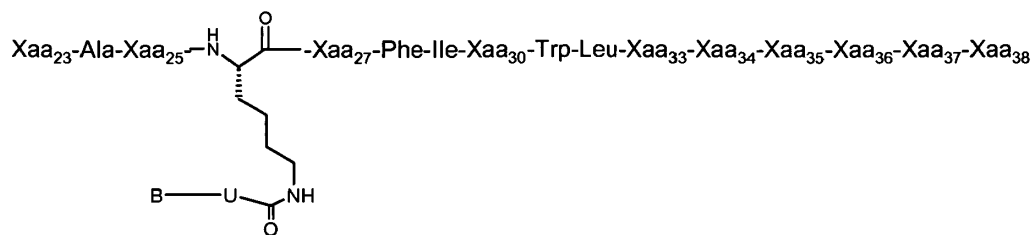
40	Compuesto del Ejemplo 4	6,25 mg/ml
	Propilenglicol	14,0 mg/ml
	Fenol	5,5 mg/ml

Tampón de fosfato de pH 8,15

45 Opcionalmente, el compuesto se trata con calor y/o base antes de la formulación como se describe en WO 2006/051110.

REIVINDICACIONES

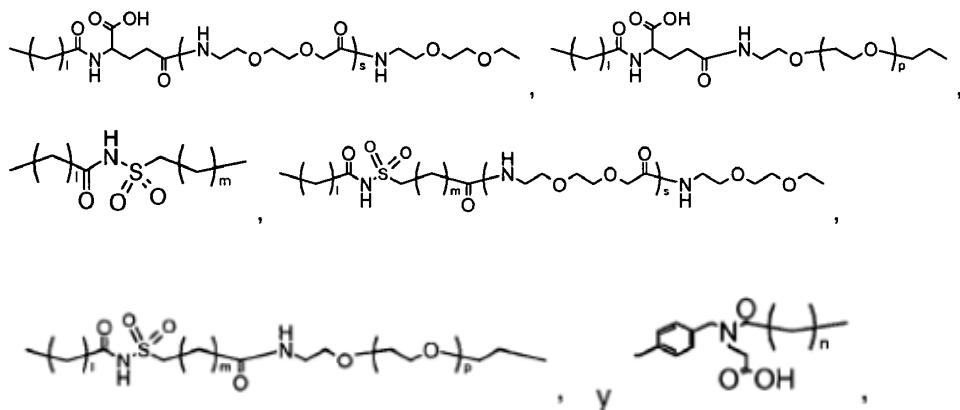
1. Un análogo de GLP-1 de fórmula II:



en donde

Xaa₇ es L-histidina; Xaa₈ es Aib; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly o Aib; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Arg; Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Gly; Xaa₃₈ está ausente; y

donde U es un espaciador seleccionado de



donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18,

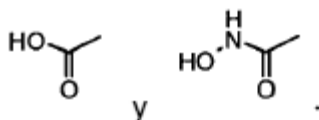
l es 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18,

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6,

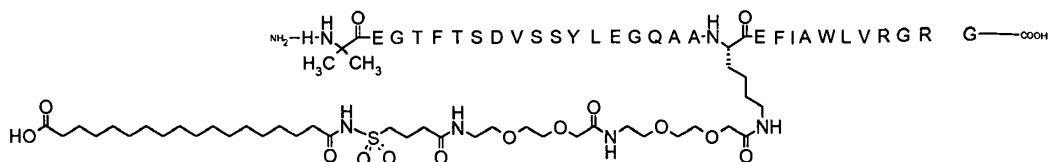
s es 0, 1, 2 ó 3,

p es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23; y

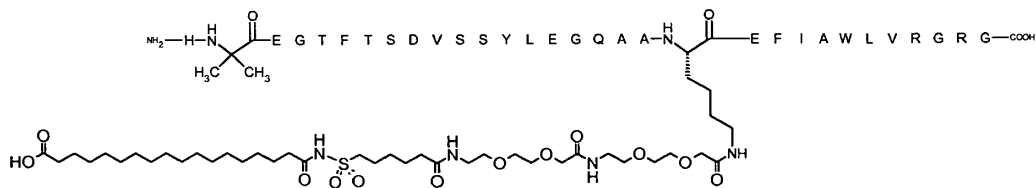
donde B es un grupo ácido seleccionado de



2. Un compuesto seleccionado de los siguientes:



y



3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. Uso de un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de un medicamento.
5. Uso de un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad de arterias coronarias y otros trastornos cardiovasculares, ictus, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia y úlceras gástricas.
6. Uso de un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de un medicamento para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.
7. Uso de un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la preparación de un medicamento para disminución de la ingestión de alimentos, disminución de la apoptosis de las células β , aumento de la función de las células β y la masa de células β , y/o para restablecimiento de la sensibilidad de la glucosa a las células β .
8. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso como medicamento.
9. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad de arterias coronarias y otros trastornos cardiovasculares, ictus, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia y úlceras gástricas.
10. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso en el retardo o la prevención de la enfermedad en la diabetes tipo 2.
11. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso en la disminución de la ingestión de alimentos, disminución de la apoptosis de las células β , aumento de la función de las células β y la masa de células β , y/o para uso en el restablecimiento de la sensibilidad de la glucosa a las células β .