



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 820**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

C07K 14/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03763864 .0**

96 Fecha de presentación : **15.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1525218**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Oligopéptidos bicíclicos y su uso como antagonistas de receptores de glucagón.**

30 Prioridad: **17.07.2002 EP 02015907**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG.
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es: **Potterat, Olivier;**
Streicher, Rüdiger;
Wagner, Klaus;
Maurer, Till;
Mack, Jürgen y
Peters, Stefan

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 316 820 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

Oligopéptidos bicíclicos y su uso como antagonistas de receptores de glucagón.

5 La presente invención, se refiere a oligopéptidos bicíclicos o estés de éstos, los cuales tienen la capacidad de inhibir el receptor de glucagón.

Antecedentes y trasfondo de la invención

10 La patente estadounidense US 5.919.926, da a conocer depsipéptidos bicíclicos, los cuales se producen mediante la fermentación de un actinomiceto marino específico (CNB-091). Según se ensaña, estos depsipéptidos bicíclicos, son de utilidad como antibióticos y agentes antiinflamatorios.

15 El glucagón, es una hormona peptídica de 29 aminoácidos, producida por las células A, en el páncreas, y es una hormona contra-reguladora mayor, con respecto a la insulina, en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. La insulina, fomenta la absorción de la glucosa, por parte de las células, especialmente, las células musculares, y previene un excesivo deterioro del glicógeno almacenado en el hígado y en los músculos. Como una hormona antidiabética esencial para reducir el azúcar en la sangre, la insulina, es un potente agente hipoglicémico. En muchos casos, las acciones del glucagón, son contrarias a las de la insulina. Su función principal, es la de estimular la producción hepática de glucosa. El receptor de glucagón activado, señala, vía cAMP-PKA, la cascada de señalización, e incrementa la tasa de glucosa de novo-síntesis, vía gluconeogénesis y la liberación de glucosa procedente de las reservas de glicógeno, vía glicogenólisis.

25 La diabetes, es una enfermedad compleja, caracterizada por hiperglicemia, resultante de la secreción defectuosa de insulina, acción defectuosa de la insulina, o ambos. Las complicaciones metabólicas de la diabetes - la hiperglicemia y la cetosis - se encuentran asociadas con el incremento relativo o absoluto del valor de relación del glucagón con respecto a la insulina. Así, de este modo, el glucagón, es un factor hiperglicémico, el cual provoca el que incremente el azúcar en la sangre. Correspondientemente en concordancia, un medio para bloquear la diabetes, es el consistente en bloquear el receptor de glucagón, con un apropiado antagonista, inhibiendo, con ello, la producción de glucosa, por parte del hígado, y reduciendo los niveles de glucosa en el paciente.

30 Varias publicaciones, dan a conocer antagonistas de receptores de glucagón, peptídicos y no peptídicos (McComick *et al.*, Curr Pharm. Des. 7.1451 (2001), para revisión). La inhibición de la producción de glucosa estimulada mediante glucagón, en humanos, ha sido reportada para Bay 27-9955 (Petersen *et al.*, Diabetología 44, 2018 (2001)).

35 Se ha descubierto ahora, de una forma sorprendente, el hecho de que, ciertos oligopéptidos bicíclicos, son inhibidores altamente eficaces del receptor de glucagón, y son, por lo tanto, de uso potencial en el tratamiento o la profilaxis de la hiperglicemia y, en particular, en el tratamiento de la diabetes mellitus (Tipo I y Tipo II).

40 Estos oligopéptidos bicíclicos, según se indica, son también de un uso potencial para el tratamiento o la profilaxis de otras enfermedades, incluyendo a la IGT (tolerancia debilitada a la glucosa), síndromes de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, dislipidemia, arteriosclerosis, enfermedades cardio-vasculares, hipertensión, hipertrofia cardíaca, aclaramiento incrementado de la albúmina renal, pancreatitis, obesidad, trastornos gastrointestinales, ciertos trastornos de la alimentación, y como una terapia para incrementar la secreción gástrica de ácidos.

Resumen de la invención

50 Correspondientemente en concordancia, la presente invención, se refiere a nuevos oligopéptidos bicíclicos, según la reivindicación 1, que tienen la capacidad de inhibir el receptor de glucagón.

55 Otro aspecto de la invención, son los oligopéptidos bicíclicos, según la invención, tal y como se definen en las reivindicaciones, para su uso como un medicamento.

60 Adicionalmente, además, la invención, se refiere a un composición farmacéutica que comprende por lo menos un oligopéptido bicíclico en concordancia con la presente invención, y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, y al uso de un oligopéptido bicíclico en concordancia con la presente invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades, en el cual se encuentran involucrados los receptores de glucagón.

65 Otro aspecto de la invención, es un procedimiento para el tratamiento o la prevención de enfermedades, en el cual se encuentran involucrados receptores de glucagón, procedimiento éste, el cual comprende la administración de una cantidad efectiva de un oligopéptido bicíclico en concordancia con la presente invención, a un paciente en necesidad de éste.

Descripción detallada de la invención

Los oligopéptidos bicíclicos en concordancia con la invención, se presentan en las reivindicaciones anexas.

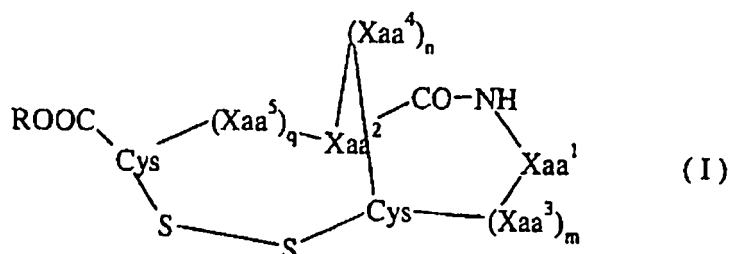
5 Las formas de presentación específicas de la invención, incluyen tipos de oligopéptidos bicíclicos, los cuales se obtienen mediante el aislamiento de un *Actinomyces*, de una forma preferible, una especie *Streptomyces*, de una forma particular, el microorganismo que se encuentra depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest, bajo el número de acceso DSM 14996, y opcionalmente derivatizado, subsiguientemente, mediante esterificación.

10 De una forma preferible, las especies de *Streptomyces*, se cultivan en un medio que comprende harina de soja, glucosa, cloruro sódico, CaCO_3 , KH_2PO_4 , glucosa - peptona de caseína, extracto de levadura, extracto de carne y agua, a un valor pH de 6,5 a 7, de una forma particular, de 6,8 a 7,3, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 25 a 35°C, de una forma particular, a una temperatura de aproximadamente 28°C.

15 El oligopéptido bicíclico, es susceptible de poderse obtener, de una forma preferible, a partir del citado caldo de fermentación, mediante extracción con un disolvente orgánico polar, de una forma preferible, un alcohol, tal como metanol y etanol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o mezclas de éstos, de una forma mayormente preferible, una mezcla de metanol y DMSO, en donde, el valor de relación de metanol con respecto a DMSO, es el correspondiente a unos valores que van de 1000 : 1 a 10 : 1, de una forma particular, de 500 : 1 a 100 : 1. El extracto, de una forma preferible, se concentra al vacío y, el extracto concentrado, se enriquece mediante cromatografía, de una forma particular, mediante HPLC preparativa, utilizando un tampón de acetonitrilo y acetato amónico (pH 3 - 5), de una forma particular, en forma de un gradiente de 2 - 60% de tampón de acetonitrilo y acetato amónico, como eluyente. El producto enriquecido, de una forma preferible, se purifica mediante cromatografía de columna, utilizando un alcohol, como eluyente, de una forma preferible, metanol.

25 La esterificación opcional, se lleva a cabo utilizando procedimientos de esterificación standard, de una forma preferible, mediante la reacción de un oligopéptido bicíclico con trimetilsilildiazometano, de una forma particular, en forma de una solución 2N en hexano, en un disolvente orgánico polar, de una forma preferible, acetonitrilo o metanol, o una mezcla de éstos. La mezcla de reacción, se purifica, de una forma preferible, mediante HPLC preparativa, y se seca mediante congelación (liofilización).

Los oligopéptidos bicíclicos en concordancia con la presente invención, se caracterizan mediante la fórmula I,



50 en donde,

Xaa¹, representa un α -aminoácido N-terminal, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina y valina, de una forma particular, glicina;

55 Xaa², representa un ácido aspártico o glutámico, de una forma particular, ácido aspártico;

60 Xaa³, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina, valina, prolina y triptófano, de una forma particular, glicina, leucina, prolina y triptófano;

Xaa⁴, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina, valina, prolina y serina, de una forma particular, prolina y serina; y

65 Xaa⁵, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, isoleucina, leucina, norleucina, valina, prolina, treonina, asparagina, triptófano y serina, de una forma particular, glicina, alanina, isoleucina, prolina, treonina, asparagina, triptófano y serina;

ES 2 316 820 T3

m, representa un número entero de 3 a 6, de una forma particular, 4;

n, representa un número entero de 2 a 4, de una forma particular, 2;

5 q, representa un número entero de 6 a 12, de una forma particular, 9; y

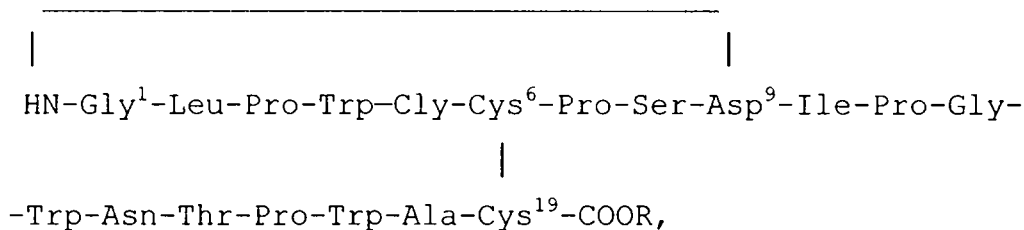
R, representa un átomo de hidrógeno, ó un grupo alquilo C₁₋₆, de una forma particular, un grupo metilo.

Se prefiere, mayormente, un nonadecapéptido o un éster de éste, caracterizado por las siguiente secuencia:

10

15

20



en donde,

25

el grupo amino de Gly, se encuentra unido con el grupo β -carboxilato de Asp⁹, vía un grupo amido,

los grupos tiol de las cisteínas Cys⁶ y Cys¹⁹, se encuentran unidos, vía un puente disulfuro, y

R, es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo.

30

Adicionalmente al procedimiento para aislar los oligopéptidos bicíclicos de la especie *Streptomyces* los compuestos de la presente invención, pueden prepararse sintéticamente, a partir de aminoácidos, aplicando una síntesis standard de péptidos en fase sólida.

35

La matriz polimérica, puede seleccionarse a partir de fuentes comercialmente disponibles en el comercio, de una forma preferible, poliestireno, polietilenglicol, o resinas de poliacrilamida.

40

El engarce, se selecciona de una forma tal que, después de la segmentación de la resina, el péptido, se libera, conteniendo un ácido carboxílico en el término C. Así, por lo tanto, de una forma preferible, son aplicables la denominada resina de clorotritilo que porta dos engarces de 2-clorotritilo, o la denominada resina de Wang, que contiene el engarce de 4-hidroximetilfenoxibencilo, encontrándose ambas comercialmente obtenibles en el comercio. Debido a las conocidas reacciones secundarias en la síntesis de péptidos con residuos de cisteína C-terminal, como la formación de dicetopiperazina, es recomendable el iniciar con resina de H-Cys(Acm)-2-clorotritilo (Nova Biochem), comercialmente disponible en el mercado).

45

El ensamblaje de péptidos por etapas, se realiza, de una forma preferible, bajo condiciones standard, utilizando amino-ácidos N α -Fmoc-protectidos (PG1), y reactivos de activación *en situ*, como el TBTU. Las cadenas secundarias, en los aminoácidos, se encuentran protegidas de la forma usual, para la síntesis de Fmoc/tBu-péptidos, por ejemplo, tBu, para serina y treonina, tritilo para asparagina, Boc para triptófano (PG2).

50

Los residuos de cisteína, deberían protegerse mediante grupos protectores, los cuales pueden retirarse de una forma selectiva, al final de la síntesis. Para este propósito, de una forma preferible, se selecciona el grupo acetamidometilo (ACM) (PG3), el cual es estable frente a TFA.

55

Para la ciclización sobre resina de Asp ó Glu, de una forma particular, Asp y el aminoácido N-terminal, de una forma particular, Gly, la cadena secundaria de ácido carboxílico de Asp ó Glu, de una forma particular, de ácido aspártico, debe desprotegerse selectivamente, sin segmentar el péptido, del soporte sólido. A dicho efecto, es mayormente apropiado, un grupo protector aliléster.

60

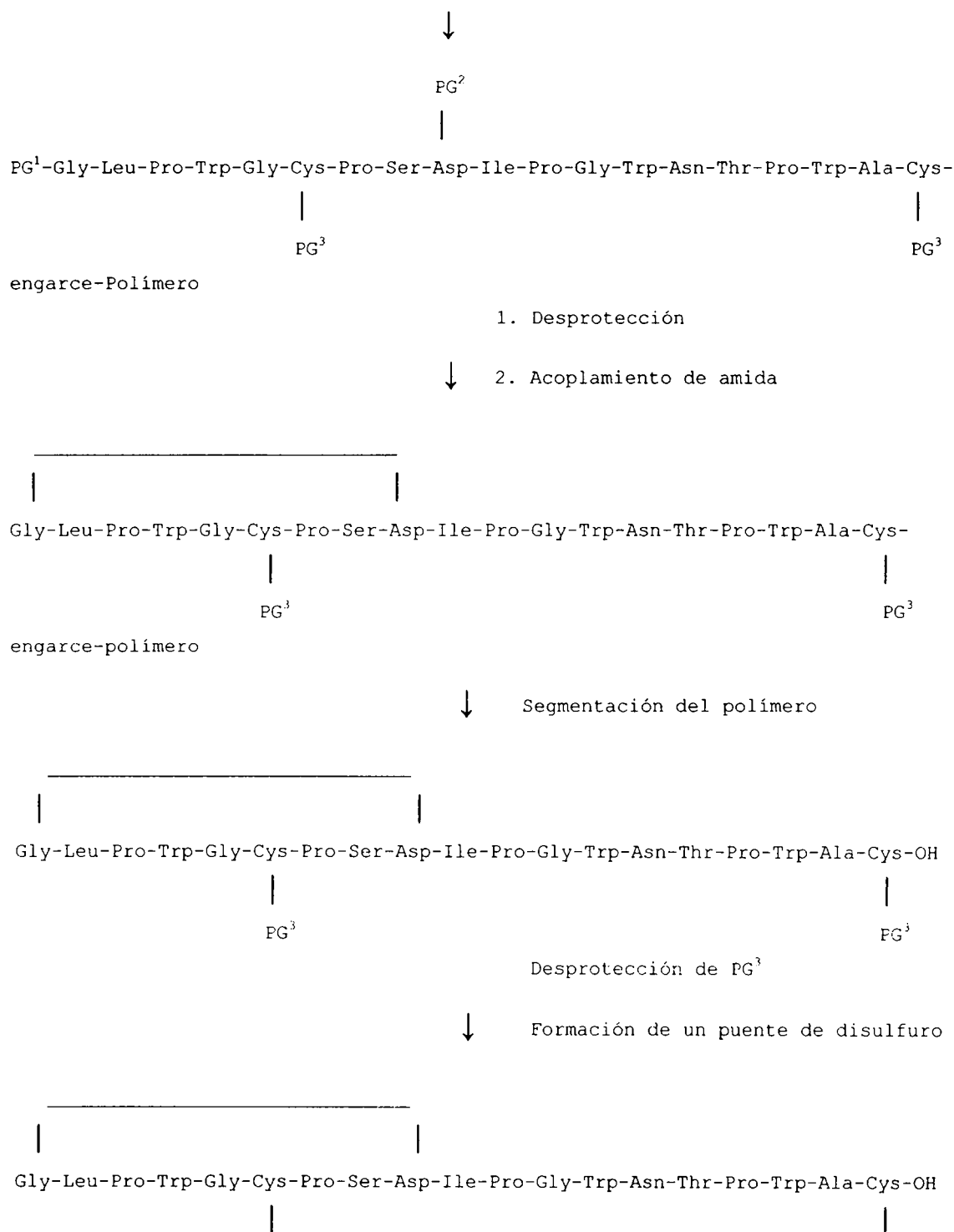
El ensamblaje peptídico, se realiza, como norma, bajo unas condiciones standard, hasta que se haya completado el acoplamiento de aminoácido Fmoc-protectido N-terminal, de una forma particular, el residuo de Fmoc-glicina. Para la ciclización del aminoácido N-terminal, de una forma particular, glicina-1, y el ácido aspártico ó glutámico, es necesario desproteger el amino y la función ácido, de ambos aminoácidos, respectivamente. El aliléster del ácido aspártico ó glutámico, puede segmentarse, aplicando catalizadores de paladio, de una forma preferible, Pd(PPh₃)₄, en presencia de un nucleófilo, de una forma preferible, dimedona, ácido barbitúrico o dimetilamina. El grupo Fmoc, del grupo N-terminal, de una forma particular, glicina, puede retirarse, como norma, con piperidina al 20% en DMF. La formación del anillo, puede realizarse mediante reactivos standard de acoplamiento de péptidos, de una forma preferible, TBTU.

65

ES 2 316 820 T3

La segmentación del péptido, del polímero, puede realizarse con ácido trifluoroacético (TFA), de una forma preferible, TFA al 50% en diclorometano. Utilizando estas condiciones, se retiran, también, los grupos protectores tritilo, tBu y Boc, en el péptido. En esta etapa, es recomendable el proceder a purificar el péptido, mediante HPLC de fase inversa. La desprotección de los residuos de cisteína y la formación de disulfuro, se lleva a cabo, de una forma preferible, con sales de mercurio (II), de una forma preferible, acetato de mercurio (II), ó yodo. El esquema de reacción que se facilita a continuación, ilustra las síntesis peptídico en fase sólida del oligopéptido bicíclico en concordancia con la presente invención.

Síntesis peptídica en fase sólida



Tal y como se ha indicado anteriormente, arriba, la presente invención, proporciona, también, un oligopéptido bicíclico, según la reivindicación 1, ó una sal de éste, farmacéuticamente aceptable y/o un solvato de éste, farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la hiperglicemia, la hiperlipidemia, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y ciertos trastornos de la alimentación.

Un oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, pueden administrarse, “*per se*”, o de una forma preferible, como una composición farmacéutica, que comprenda también un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Correspondientemente en concordancia, la presente invención, proporciona, también, una composición farmacéutica que comprende un oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, el término “farmacéuticamente aceptable”, abarca compuestos, composiciones e ingredientes, para ambos usos, el uso humano y el uso veterinario: por ejemplo, el término “sal farmacéuticamente aceptable” abarca una sal aceptable desde el punto de vista veterinario.

La composición, en caso deseado, puede ser en forma de un “pack”, acompañado de instrucciones escritas o impresas para su uso.

De una forma usual, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se adaptarán para la administración oral, si bien pueden también pretenderse composiciones para la administración a través de otras rutas, tales como, por ejemplo, la inyección o la absorción percutánea.

La composiciones particularmente apropiadas para la administración oral, son formas de dosificación oral, tales como las tabletas y las cápsulas. Otras formas de dosificación fijadas, tales como las formas en polvo presentadas en saquitos, pueden también ser utilizadas.

En concordancia con la práctica farmacéutica convencional, el portador o vehículo, puede comprender un diluyente, una carga, un desintegrante, un agente humectante, un lubricante, un colorante, un saborizante (condimento), u otros adyuvantes convencionales.

Los vehículos o portadores típicos, incluyen, por ejemplo, a la celulosa microcristalina, almidón, glicolato sódico de almidón, polivinilpirrolidona, polivinilpoli-pirrolidona, estearato magnésico, laurilsulfato sódico, o sucrosa.

De la forma mayormente apropiada, la composición, se formulará en forma de dosis unitaria. Tal tipo de dosis unitaria, contendrá, normalmente, una cantidad de ingrediente activo, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 0,01 a 100 mg, de una forma más usual, de 0,1 a 500 mg y, de una forma más especial, de 0,1 a 250 mg.

La presente invención, proporciona adicionalmente un procedimiento para el tratamiento y/o profilaxis de la hiperglicemia, en un mamífero humano o no humano, el cual comprende la administración de una cantidad efectiva, no tóxica, de un compuesto del oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, ó una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, a un mamífero humano o no humano hiperglicémico, en necesidad de éste.

La presente invención, proporciona adicionalmente un procedimiento para el tratamiento y/o profilaxis de la hiperlipidemia, en un mamífero humano o no humano, el cual comprende la administración de una cantidad efectiva, no tóxica, de un oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, ó una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, a un mamífero humano o no humano hiperlipidémico, en necesidad de éste.

De una forma conveniente, el ingrediente activo, puede administrarse como una composición farmacéutica, definida anteriormente, arriba, y esto forma un aspecto particular de la presente invención.

En el tratamiento y/o profilaxis de humanos hiperglicémicos, y/o el tratamiento y/o la profilaxis de humanos hiperlipidémicos, puede tomarse el oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, ó una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, en dosis, tales como las que se han descrito anteriormente, arriba, una o seis veces por día, de tal forma que, la dosis diaria total, para un adulto de 70 kg de peso, será, generalmente, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 0,1 a 6000 mg y, de una forma más usual, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de aproximadamente 1 a 1500 mg.

En el tratamiento y/o profilaxis de la mamíferos no humanos hiperglicémicos, especialmente, perros, el ingrediente activo, puede administrarse por vía bucal, usualmente, una o dos veces al día, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de aproximadamente 0,025 mg/kg a 25 mg/kg, por ejemplo,

de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Regímenes similares de dosificación, son apropiados, para el tratamiento y/o profilaxis de hiperlipidemia, en mamíferos no humanos.

Los oligopéptidos bicíclicos en concordancia con la presente invención, pueden administrarse solos, o en combinación con otro agente activo, el cual se utiliza, de una forma conveniente, en el tratamiento o la profilaxis de la hiperglicemia, hiperlipidemia, obesidad e hipertensión.

De una forma particular, los compuestos en concordancia con la presente invención, pueden utilizarse en combinación con uno o más agentes antidiabéticos. Los agentes antidiabéticos, comprenden a las biguanidas, inhibidores de glucosidasa, gama moduladores de PPAR, alfa/gama-agonistas duales de PPAR, moduladores de RXR, inhibidores de SGLT2, inhibidores de aP2, sensibilizadores de insulina, GPL-1 ó similares, inhibidores de DPPIV, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK-3 y/o una metiglinida. El agente antidiabético es, de una forma específica, metformina, gliburida, glibenclamida, glimepirida, glipirida, glipizida, cloropropamida, glicazida, acarbosa, miglitol, pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona, insulina, isaglitazona, repaglinida, nateglinida, y/o exedin-4.

Los compuestos de la invención, pueden utilizarse en combinación con agentes moduladores de lípidos. Los agentes moduladores de lípidos, comprenden inhibidores de HMG CoA- reductasa, derivados del ácido fibríco, inhibidores de CETP, inhibidores de ACAT, inhibidores de MTP, inhibidores de esqualeno ciclase y esqualeno sintetasa, moduladores de LXR y/o secuestrantes del ácido biliar. El agente modulador de lípidos es, de una forma especial, pravastatina, lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato, colestiramina, colestipol, probucol, ácido nicotínico, implitapida y/o avasimibe.

Los compuestos de la presente invención, pueden utilizarse en combinación con agentes anti-obesidad. Los agentes antiobesidad, comprenden inhibidores de lipasa, inhibidores de reabsorción de serotina y dopamina, agonistas beta3-adrenérgicos, antagonistas de MCH, agonistas de MC4, leptina o semejantes, sobre-reguladores de oxidación y/o inhibidores de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. El agente antiobesidad es, de una forma especial, orlistat, sibutramina, topiramato, axocina, dexanfetamina, fentemida, fenilpropanolamina, famoxin y/o mazindol.

Los compuestos de la invención, pueden utilizarse en combinación con agentes cardiovasculares. Los agentes cardiovasculares, comprenden bloqueantes alfa-adrenérgicos, inhibidores de enzimas de conversión de angiotensina, bloqueantes de receptores de angiotensina II, agentes antiarrítmicos, anticoagulantes, agentes antiplaquetas, agentes trombolíticos, bloqueantes beta-adrenérgicos, antagonistas de calcio, agentes hipertensores de actuación central, diuréticos, bloqueantes neuronales y ganglionales y/o vasodilatadores. El agente cardiovascular es, de una forma específica, doxazosina, prazosina, terazosina, benazepril, captopril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moexipril, quinapril, ramipril, trandolapril, irbesartan, losartan, valsartan, temisartan, disopiramida, flecainida, ibutilida, lidocaína, mexiletina, moricicina, procainamida, propafenona, quinidina, tocainida, amiodaron, bretilium, anisindiona, dicumerol, heparina, warfarina, abcisimab, anagrelida, aspirina, clopidogrel, dipiridamol, ticlopidina, alteplasa, anistreplasa, reteplasa, estreptocinasa, urocinasa, nadalol, propanolol, sotalol, timolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, esmolol, metoprolol, acebutolol, carteolol, penbutolol, pindolol, carvedilol, labetalol, amlodipina, bepridil, diltiazem, felodipina, isradipina, mibefradil, nicardipina, nifeldipina, nimodipina, verapamil, clonidina, guanabenz, guanfacina, metildopa, bumetadina, ácido etacrínico, furosamida, torsemida, bendroflumetiazida, bentiazida, clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, metalazona, politiazida, quinetazona, triclormetiazida, amilorida, espironolactona, guanadrel, guanetidina, mecamilamina, reserpina, ciclandelato, fenoldopam, hidralazina, minoxidil, pentoxifilina, fenoxibenzamina, eritritilo tetranitrato, isoborbida, nitroglicerina y/o nitroprusida,

Los regímenes de dosificación para el tratamiento de otras enfermedades (por ejemplo, hipertensión, enfermedad cardiovascular y trastornos de la alimentación), serán, de una forma general, aquéllos mencionados anteriormente, arriba, con relación a la hiperglucemia.

En un aspecto adicional, la presente invención, proporciona el uso de un oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, ó una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hiperglicemia.

La presente invención, proporciona, también, el uso de un oligopéptido bicíclico en concordancia con la reivindicación 1, ó una sal farmacéuticamente aceptable de éste y/o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hiperlipidemia, la hipertensión, enfermedades cardiovasculares o ciertos trastornos de la alimentación.

Una ventaja mayor de los oligopéptido bicíclico en concordancia con al presente invención, es su alta afinidad del receptor de glucagón, y su sorprendente estabilidad en medio fisiológico.

Los ejemplos que se facilitan a continuación, sirven para ilustrar la presente invención. Éstos deben interpretarse como siendo meramente ilustrativos, proporcionados únicamente como ejemplos, sin restringir la invención a su contenido.

ES 2 316 820 T3

Ejemplo 1

Preparación y aislamiento de un nonadecapéptido bicíclico de la siguiente secuencia

Gly-Leu-Pro-Trp-Gly-Cys-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Gly-Trp-Asn-Thr-Pro-Trp-Ala-Cys-OH

Preparación

(a) *Precultivo*

Se procede a preparar 100 ml del siguiente medio de cultivo, en matraces Erlenmeyer con 4 chicanos o bocas:

Harina de soja 15,0 g, glucosa 15,0 g, cloruro sódico 5,0 g, CaCO_3 1,0 g, CaCO_3 1,0 g, KH_2PO_4 0,3 g, y agua, resto hasta 100 ml, pH 6,9. Una pequeña rodaja de agar, con un tallo bien cultivado de streptomycetes DSM 14996, sirve como inóculo. Los matraces, se agitan durante un transcurso de tiempo de 48 horas, a revoluciones por minuto, y a una temperatura de 28°C.

b) *Fermentación*

Se procede a preparar 250 ml de un medio de glucosa - peptona de caseína, en matraces Erlenmayer de 1 l:

Glucosa 20,0 g, peptona de caseína 4,0 g, extracto de levadura 0,5 g, cloruro sódico 2,5 g, CaCO_3 3,0 g, agua resto hasta 1000 ml, pH 7,2. Cada uno de los matraces, se inocula con 20 ml de pre-cultivo, y se mantiene, durante un transcurso de tiempo de 120 horas, a 160 revoluciones por minuto, y a una temperatura de 28°C.

2. *Aislamiento*

(a) *Extracción*

Los micelios y el liofilizado procedente de 6 l de caldo de cultivo, se combinan y se extraen con una mezcla de MeOH (21 y 11) y DMSO (2 x 5 ml), dos veces. El extracto, se concentra a un volumen remanente de aproximadamente 40 ml (extracto A) al vacío. El precipitado de éste, se centrifuga y se disuelve, en una mezcla de MeOH (6 ml) y DMSO (3 ml), la cual se añade al extracto concentrado (extracto A).

(b) *Cromatografía*

El extracto resultante A, se purifica mediante HPLC preparativa, en porciones de 1,8 ml, con una columna Nova-Pack C-18 (Waters, 6 μm , 2,5 x 10 cm), con pre-columna (2,5 x 1,0 cm). Un gradiente del 5 - 51% CH_3CN , contra un tampón de acetato amónico 1 mM (pH 4), en un transcurso de tiempo de 16 minutos, sirve como eluyente. El caudal de flujo, es de 20 ml/minuto. El péptido, se detecta mediante absorción UV, a 220 nm. A continuación, el péptido enriquecido, se purifica sobre una columna Sephadex LH-20 (2,5 x 70 cm), en porciones de 100 mg, utilizando MeOH (1,0 ml/minuto), para proporcionar 25 mg/l del producto deseado, puro.

Ejemplo 2

Esterificación del compuesto del ejemplo 1

Se procede a añadir una mezcla de trimetilsilildiazometano (solución 2N en hexano, 0,048 ml, 0,096 mmol) y acetonitrilo/metanol (9/1, 0,85 ml), a una mezcla del nonadecapéptido bicíclico preparado en el ejemplo 1 (23,7 mg, 0,0116 mmol) y 0,85 ml de DMSO. Después de un transcurso de tiempo de 20 horas, se procede a añadir otra porción de trimetilsilildiazometano (solución 2N en hexano, 0,048 ml, 0,096 mmol). Se procede, a continuación, a controlar la reacción, mediante LC-MS, indicando el hecho de que, un porcentaje del 75% del ácido (tiempo de retención = 5,84

ES 2 316 820 T3

minutos, (M+H)-:2035, (M-2H)²-:1017), se ha convertido en el éster metílico, (tiempo de retención = 5,96 minutos, (M+H)+:2051, (M+2H)+:1026). La mezcla de reacción, se purifica mediante HPLC preparativo y se seca mediante congelación (se liofiliza).

5 Los compuestos de los ejemplos 1 y 2, muestran las siguientes propiedades:

Ejemplo 1

10 C95H125N23O24S2 MW 2035,87 (monoisotrópico) 2027,3 (media).

Ejemplo 2

15 C96H127N23O24S2 MW 2049,89 (monoisotrópico) 2051,3 (media) y las siguientes solubilidades:

Ejemplo 1

20	Tampón pH 3,0:	0,003 mg/ml
	Tampón pH 7,4:	0,120 mg/ml
	Tampón pH 10,0:	0,092 mg/ml

Ejemplo 2

25	Tampón pH 3,0:	0,003 mg/ml
	Tampón pH 7,4:	0,002 mg/ml
30	Tampón pH 10,0:	0,004 mg/ml

Ejemplo 3

35 *Ensayo de enlace de glucagón*

Se procedió a ensayar el enlace de péptidos al receptor de glucagón, en un ensayo de enlace competitivo, utilizando una fracción de membrana que contenía el receptor de glucagón humano clonado, y glucagón radiomarcado.

40 El cDNA que codifica para el receptor de glucagón humano, se clonó en un vector de expresión pcDNA3.1 (Invitro-gene). Se procedió a transferir células de riñón de hámster bebé (células BHK-21(C-13)(ATCC)), con la construcción de expresión para el receptor de glucagón humano y se aisló un clon, de células transfectadas de forma estable, después de la selección con G-418 (Gibco).

45 Se procedió a preparar membranas de plasma que contenían el receptor de glucagón humano, a partir de células BHK-21, transfectadas de una forma estable: las células se hicieron crecer hasta la confluencia, se lavaron, y se separaron con tampón de PBS (Gibco) enfriado mediante hielo, que contenía 0,05% EDTA, y se recogieron en tampón PBS. Las células se recogieron mediante centrifugación, y se suspendieron en 20 volúmenes de tampón tris enfriado mediante hielo (10 mM tris/HCl, pH 7,2; 0,01 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y se incubaron durante un transcurso de tiempo de 90 minutos. Todas las etapas ulteriores, se realizaron a una temperatura de 4°C. La suspensión, se lisó completamente, mediante 10 carreras de un homogeneizador del tipo Dounce. Los fragmentos o residuos de los núcleos y de las células, se separaron mediante centrifugación, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a 500 g. El sobrenadante, se centrifugó, a continuación, a 100.000 g, durante un transcurso de tiempo de 35 minutos. Las membranas precipitadas, se suspendieron en un tampón de incubación (50 mM tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,2% albúmina de suero bovino, pH 7,2), se alicuotaron, y se almacenaron a una temperatura de -80°C.

Después de deshelarlas, las membranas de células BHK que expresaban el receptor de glucagón humano, se resus-pendieron en tampón de incubación, completado con 0,01 mM PMSF.

60 En la medición de la competencia con el enlace de glucagón, se procedió a incubar 20 µg de la suspensión de membrana, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, en placas de microtítulo cubiertas (Optiplate, Packard Instruments) con 50.000 cpm 125I-glucagón (Amersham Pharmacia), y una concentración del compuesto de test de ensayo, en un volumen total de 100 µl. La radioactividad enlazada en la proteína, se separa del ligando no ligado, mediante filtración y lavado en un sistema de filtración al vacío de multipantalla (Millipore), utilizando filtros GC/B (Packard), y se mide, después de la adición de 20 µl Microscint 20, en un contador de centelleo de recuento superior (Packard). El enlace no específico, se define como radiactividad enlazada, en presencia de 1 µM glucagón (Wherl GmbH).

ES 2 316 820 T3

Correspondientemente en concordancia, puede calcularse un valor de IC_{50} , a partir de los resultados obtenidos en el procedimiento de test de ensayo de arriba. Los oligopéptidos bicíclicos, muestran las siguientes actividades:

Ejemplo 1: $IC_{50} = 100 \text{ nM}$;

Ejemplo 2: $IC_{50} = 135 \text{ nM}$.

Ejemplo 4

Estabilidad metabólica

Las incubaciones con preparaciones de microsomas y citosol y con plasma, en unas condiciones como las que se describen abajo, a continuación, son apropiadas para investigar la estabilidad metabólica de los compuestos de ensayo (Por ejemplo, reacciones oxidantes del metabolismo e hidrólisis mediante esterasas). Se procede a investigar la estabilidad metabólica de los compuestos de ensayo de los ejemplos 1 y 2, en microsomas del hígado y citosol de humanos, perros y ratas, y en el plasma de humanos y ratas.

Estabilidad con microsomas y citosol

Se procede a realizar incubaciones de los compuestos de ensayo (concentración final: $1 \mu\text{M}$), con microsomas de hígado y citosol ($0,5 \text{ mg proteína/ml}$) en tampón Tris (Tris-(hidroximetil)-aminometano) pH 7,4 ($0,1 \text{ M}$) con contenido de cloruro magnésico (5 mM), a una temperatura de 37°C , durante un transcurso de tiempo de hasta 45 minutos, en un volumen local de $100 \mu\text{l}$). La reacción, se inicia mediante la adición de β -nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH, 1 mM), y se termina mediante la adición de acetonitrilo. Después de la mezcla mediante vórtice y centrifugación, se analizan los sobrenadantes.

Estabilidad en plasma

Se procede a realizar incubaciones de los substratos de ensayo (concentración final: $1 \mu\text{M}$), con plasma humano y de rata (heparina), que contiene $0,1 \text{ M}$ tampón Tris, pH 7,4. La reacción, se inicia mediante la adición del compuesto de ensayo, a una temperatura de 37°C , durante un transcurso de tiempo de 45 minutos, y se termina mediante la adición de acetonitrilo. Después del mezclado con vórtice y centrifugación, se procede a analizar los sobrenadantes.

Analítica

Se procede a analizar las muestras, mediante extracción en fase sólida, en línea, y HPLC de fase inversa, acoplada a electro-ionización mediante proyección pulverizada (spray) tandem espectrometría de masa. Las mediciones, se realizan un espectrómetro de masas, del tipo "Tiple quad mass spectrometer Quattro II" (Micromass, Manchester, UK). El instrumento, opera a una resolución de masa nominal, en modo SIR. Los analitos, se cuantifican mediante detección de sus iones quasimoleculares $[M+2H]^{2+}$ m/z 1019 (ejemplo 1) y m/z 1026 (ejemplo 2).

Se obtienen las siguientes estabilidades:

Substrato (conc. inicial): $1 \mu\text{M}$

Tiempos de vida media, ($t_{1/2}$ [minutos])

Especie	Rata			Perro		Humano		
	Micros	Citosol	Plasma	Micros	Citosol	Micros	Citosol	Plasma
Ejemplo 1	estable	estable	estable	estable	estable	estable	estable	182
Ejemplo 2	estable	73	estable	estable	140	estable	122	180

ES 2 316 820 T3

Ejemplo 5

Ejemplos de formulaciones farmacéuticas

5

	A) <u>Tabletas</u>	<u>por tableta</u>
10	Substancia activa (Ejemplo 1)	50 mg
	Lactosa	170 mg
	Almidón de maíz	260 mg
15	Polivinilpirrolidona	15 mg
	Estearato magnésico	5 mg
20		<hr/>
		500 mg

25

30 La substancia activa finamente molida, la lactosa y algo del almidón de maíz, se mezclan conjuntamente. La mezcla, se tamiza y, a continuación, se humedece con una solución de polivinilpirrolidona en agua, se amasa, se granula en húmedo, y se seca. Los gránulos, el almidón de maíz remanente y el estearato magnésico, se tamizan y se mezclan conjuntamente. La mezcla, se comprime, para producir tabletas de una forma y tamaño adecuados.

35

	B) <u>Tabletas</u>	<u>por tableta</u>
	Substancia activa (Ejemplo 1)	40 mg
40	Almidón de maíz	210 mg
	Lactosa	65 mg
	Celulosa microcristalina	40 mg
45	Polivinilpirrolidona	20 mg
	Almidón carboximetil sódico	23 mg
50	Estearato magnésico	2 mg
		<hr/>
55		400 mg

60

65 La substancia activa finamente molida, algo del almidón de maíz, la lactosa, la microcelulosa microcristalina y la polivinilpirrolidona, se mezclan conjuntamente, la mezcla, se tamiza y se trabaja con el almidón de maíz restante y agua, para formar un granulado, el cual se seca y se tamiza. Se añaden el almidón carboximetil-sódico y el estearato magnésico, y se mezclan en éste y, la mezcla, se comprime, para producir tabletas de una forma y tamaño adecuados.

65

ES 2 316 820 T3

C) Tabletas recubiertas por tableta recubierta

Substancia activa (Ejemplo 1)	5 mg
Almidón de maíz	41,5 mg
Lactosa	30 mg
Polivinilpirrolidona	3 mg
Estearato magnésico	0,5 mg
	<hr/>
	80 mg

Se procede a mezclar a fondo la substancia activa, el almidón de maíz, la lactosa y la polivinilpirrolidona, y se humedece con agua. La masa húmeda, se empuja a través de un tamiz, con un tamaño de malla de 1 mm, se seca a una temperatura de aproximadamente 45°C y, los gránulos, se pasan, a continuación, a través del mismo tamiz. Después de que el estearato magnésico se haya mezclado en la mezcla anterior, se procede a comprimir núcleos de tabletas convexas, con un diámetro de 6 mm, en una máquina de fabricación de tabletas. Los núcleos de tableta de esta forma producidos, se recubren de una forma conocida, con un recubrimiento, consistente esencialmente en azúcar y talco. Las tabletas recubiertas acabadas, se pulen con cera.

D) Cápsulas por cápsula

Substancia activa (Ejemplo 1)	25 mg
Almidón de maíz	283,5 mg
Estearato magnésico	1,5 mg
	<hr/>
	310 mg

La substancia y el almidón de maíz, se mezclan y se humedecen con agua. La masa húmeda, se tamiza y se seca. Los gránulos secos, se tamizan y se mezclan con estearato magnésico. La mezcla acabada, se encapsula en cápsulas de gelatina dura, del tamaño 1.

E) solución para ampolla

Substancia activa (Ejemplo 1)	0,5 mg
Cloruro sódico	50 mg
Agua para inyección	5 mg

La substancia activa, se disuelve en agua, a su propio valor pH, ó de una forma opcional, a un valor pH de 5,5 a 6,5, y se añade cloruro sódico, para convertirla en isotónica. La solución obtenida, se filtra, exenta de pirógenos y, el

ES 2 316 820 T3

filtrado, se transfiere, bajo condiciones asépticas, al interior de ampollas, las cuales se esterilizan, a continuación, y se sellan mediante fusión. Las ampollas, contienen 0,5 mg, 2,5 mg y 5,0 mg de sustancia activa.

5

F) Supositorios

Substancia activa (Ejemplo 2)	30 mg
-------------------------------	-------

10

Grasa sólida	1670 mg
--------------	---------

15

1700 mg

20

Se procede a fundir la grasa sólida. La sustancia activa, molida, se homogeneiza y se dispersa, a una temperatura de 40°C. Ésta se enfría a una temperatura de 38°C, y se vierte en moldes para supositorios, ligeramente enfriados.

25

30

35

40

45

50

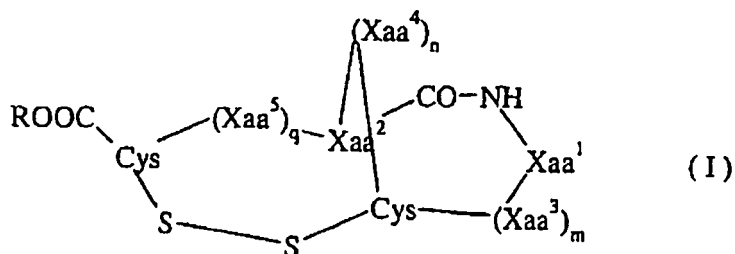
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Oligopéptido bicíclico, **caracterizado** por la fórmula I



en donde,

Xaa¹, representa un α -aminoácido N-terminal, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina y valina,

Xaa², representa un ácido aspártico o glutámico,

Xaa³, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina, valina, prolina y triptófano,

Xaa⁴, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina, norleucina, valina, prolina y serina, y

Xaa⁵, cada uno, de una forma independiente, representa un α -aminoácido, seleccionado de entre el grupo consistente en glicina, alanina, isoleucina, leucina, norleucina, valina, prolina, treonina, asparagina, triptófano y serina,

m, representa un número entero de 3 a 6,

n, representa un número entero de 2 a 4,

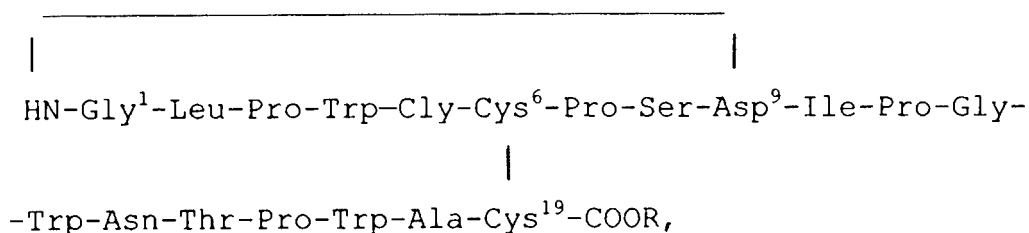
q, representa un número entero de 6 a 12, y

R, representa un átomo de hidrógeno, ó un grupo alquilo C₁₋₆.

2. Oligopéptido bicíclico, según la reivindicación 1, obtenible mediante el aislamiento a partir una especie de *Actinomyces* y, opcionalmente, seguido de esterificación.

3. Oligopéptido bicíclico, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, cada aminoácido, existe en la configuración (L).

4. Oligopéptido bicíclico, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por la siguiente frecuencia:



en donde,

el grupo amino de Gly, se encuentra unido con el grupo β -carboxilato de Asp⁹, vía un grupo amido, y

los grupos tiol de las cisteínas Cys⁶ y Cys¹⁹, se encuentran unidos, vía un puente disulfuro.

ES 2 316 820 T3

5. Oligopéptido bicíclico, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como medicamento.

6. Composición farmacéutica, que comprende por lo menos un oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un portador farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica, según la reivindicación 6, que comprende por lo menos un oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un ingrediente activo, seleccionado de entre el grupo consistente en agentes antidiabéticos, agentes moduladores de lípidos, agentes antiobesidad y agentes cardiovasculares.

8. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7, en donde, el agente antidiabético, se selecciona de entre el grupo que comprende a las biguanidas, inhibidores de glucosidasa, gama moduladores de PPAR, alfa/gama-agonistas duales de PPAR, moduladores de RXR, inhibidores de SGLT2, inhibidores de aP2, sensibilizadores de insulina, GPL-1 ó similares, inhibidores de DPPIV, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK-3 y/o una metiglinida.

9. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7 u 8, en donde, el agente antidiabético, se selecciona de entre el grupo consistente en metformina, gliburida, glibenclamida, glimepirida, glipirida, glipizida, cloropropamida, glicazida, acarbosa, miglitol, pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona, insulina, isaglitazona, repaglinida, nateglinida, y exedin-4.

10. Uso de un oligopéptido bicíclico, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, ó de una composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades, en las cuales se encuentran involucrados los receptores de glucagón.

11. Uso de un oligopéptido bicíclico, según la reivindicación 10, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de diabetes mellitus.