

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 796**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2006** **E 06725150 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 1863521**

54 Título: **Compuestos de GLP-1 extendidos**

30 Prioridad:

18.03.2005 EP 05102173

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

12.08.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd , DK

72 Inventor/es:

LAU, JESPER;

DÖRWALD, FLORENCIO ZARAGOZA;

SCHÄFFER, LAUGE y

HANSEN, THOMAS KRUSE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 484 796 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 de GLP-1 extendidos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] Esta invención se relaciona con el campo de los péptidos terapéuticos, es decir, con nuevos compuestos GLP-1 extendidos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] GLP-1 de humano es un péptido de residuo de 37 aminoácidos que se origina de preproglucagón que se sintetiza *i.a.* en las células L en el íleo distal, en el páncreas y en el cerebro. GLP-1 es una hormona del intestino importante con función reguladora en el metabolismo de la glucosa y la secreción y el metabolismo gastrointestinales. GLP-1 estimula la secreción de insulina de una manera dependiente de glucosa, estimula la biosíntesis de insulina, promueve el rescate de células beta, disminuye la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la ingesta de alimentos. GLP-1 de humano se hidroliza a GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)-amida que son péptidos insulíntrópicos. Un sistema simple se usa para describir fragmentos y análogos de este péptido. De esta manera, por ejemplo, [Gly⁸]GLP-1(7-37) designa un análogo de GLP-1(7-37) derivado anteriormente de GLP-1(7-37) sustituyendo el residuo de aminoácido que se presenta naturalmente en la posición 8 (Ala) por Gly. De manera similar, (N^{ε34}-tetradecanoil)[Lys³⁴]GLP-1 (7-37) designa GLP-1 (7-37) donde el grupo ε-amino del residuo Lys en la posición 34 se ha tetradecanoilado.

[0003] En la última década se han aislado un número de péptidos del veneno de los lagartos monstruo de Gila (*Heloderma suspectum* y *Heloderma horridum*). Exendina-4 es un péptido de residuo de 39 aminoácidos aislado del veneno de *Heloderma suspectum* y este péptido comparte el 52 % de homología con GLP-1(7-37) en la región de traslape. La exendina-4 es un potente agonista del receptor GLP-1 que se ha mostrado que estimula la liberación de insulina y que resulta en la disminución del nivel de glucosa en la sangre cuando se inyecta en los perros. El grupo de exendina-4(1-39), algunos fragmentos del mismo, sus análogos y sus derivados son potentes agentes insulíntrópicos.

[0004] Se han usado una gama de diferentes métodos para modificar la estructura de los compuestos del péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) para proporcionar una duración de acción más larga *in vivo*.

[0005] WO 96/29342 describe derivados de la hormona peptídica donde la hormona peptídica padre se ha modificado introduciendo un sustituyente lipofílico en el residuo de aminoácido C terminal o en el residuo de aminoácido N terminal.

[0006] WO 98/08871 describe derivados de GLP-1 donde por lo menos un residuo de aminoácido del péptido padre tiene enlazado un sustituyente lipofílico.

[0007] WO 99/43708 describe derivados de GLP-1(7-35) y GLP-1(7-36) que tienen un sustituyente lipofílico enlazado al residuo de aminoácido C terminal.

[0008] WO 00/34331 describe análogos de GLP-1 acilados.

[0009] WO 00/69911 describe péptidos insulíntrópicos activados que se inyectarán en los pacientes donde se supone que reacciona con los componentes de la sangre para formar conjugados y de esta forma proporcionar supuestamente una duración de acción más larga *in vivo*.

[0010] WO 02/43227 describe análogos de GLP-1 y exendina-4 fusionados a albúmina de suero de humano para extender la vida media *in vivo*.

[0011] Muchos pacientes con diabetes particularmente en el segmento de diabetes de tipo 2 son pacientes que son llamados "fobia a las agujas", es decir, un miedo sustancial para inyectarse por sí mismos. En el segmento de diabetes de tipo 2 la mayoría de los pacientes se tratan con agentes hipoglucémicos orales, y por esto los compuestos de GLP-1 se espera que sean el primer producto inyectable que se administrará a estos pacientes, el miedo a las inyecciones puede llegar a ser un obstáculo serio para el uso general de los compuestos de GLP-1 clínicamente muy prometedores. De esta manera, hay una necesidad para desarrollar nuevos compuestos de GLP-1 que pueden administrarse menos de una vez por día, por ejemplo, una vez cada segundo o tercer día, preferiblemente una vez por semana, mientras que se retiene un perfil clínico aceptable.

60 **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

[0012] La invención proporciona un análogo de GLP-1 que tiene una modificación de por lo menos un residuo de aminoácido no proteogénico en las posiciones 7 y/u 8 con relación a la secuencia GLP-1(7-37) (SEC ID NO 1), que se acila con un radical al residuo de lisina en la posición 37 o 38, y donde este radical comprende por lo menos dos grupos ácidos, donde un grupo ácido se enlaza terminalmente.

[0013] La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende tal análogo de GLP-1.

[0014] La invención proporciona el uso de tal análogo de GLP-1 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de varias enfermedades.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0015] En la presente especificación, los siguientes términos tienen el significado indicado:

[0016] El término "polipéptido" y "péptido" como se usa en la presente se refiere a un compuesto que comprende por lo menos cinco 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 se codifican por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético son, por ejemplo, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos manufacturados por la 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 (ter-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico.

[0017] Los 22 aminoácidos proteogénicos son:

Alanina, Arginina, Asparagina, Ácido aspártico, Cisteína, Cistina, Glutamina, Ácido glutámico, Glicina, Histidina, Hidroxiprolina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptófano, Tirosina, Valina.

[0018] De esta manera, un aminoácido no proteogénico es un radical que puede incorporarse en un péptido por medio de enlaces peptídicos, pero no es un aminoácido proteogénico. Son ejemplos γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, los aminoácidos D, tales como D-alanina y D-glutamina, los aminoácidos no proteogénicos sintéticos comprenden aminoácidos manufacturados por la 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 (ter-butilglicina), ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico, des-amino-Histidina, los análogos beta de los aminoácidos, tales como β -alanina, etc. D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-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.

[0019] El término "análogo" como se usa en la presente con referencia a un polipéptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácidos, y/o donde uno o más de los residuos de aminoácidos se han eliminado del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos se han adicionado al péptido. Esta adición o eliminación de los residuos de aminoácidos puede llevarse a cabo en la terminal N del péptido y/o en la terminal C del péptido. Un sistema simple a menudo se usa para describir los análogos: Por ejemplo [Arg]³⁴GLP-1(7-37)Lys designa un análogo GLP-1(7-37), donde la lisina que se presenta naturalmente en la posición 34 se ha sustituido con arginina, donde una lisina se ha adicionado al residuo de aminoácido terminal, es decir, al Gly³⁷. Todos los aminoácidos para los cuales el isómero óptico no se establece se entenderán que significa el isómero L. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 17 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 15 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 10 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 8 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 7 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 6 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 5 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 4 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En las modalidades de la invención se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En las modalidades de la invención se ha modificado un 1 aminoácido.

[0020] El término "derivado" como se usa en la presente con relación a un péptido significa un péptido modificado químicamente o un análogo del mismo, donde por lo menos un sustituyente no está presente en el péptido no modificado o un análogo del mismo, es decir, un péptido que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y similares. Un ejemplo de un derivado de GLP-1(7-37) es

$N^{626}-((4S)-4-(\text{hexadecanoilamino})-\text{carboxi-butanoil})[\text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{26}]\text{GLP-1-(7-37)}$.

[0021] El término “péptido GLP-1” como se usa en la presente significa GLP-1 (7-37) (SEC ID NO 1), un análogo GLP-1 (7-37), un derivado GLP-1(7-37) o un derivado de un análogo GLP-1 (7-37). En una modalidad, el péptido GLP-1 es un agente insulínico.

[0022] El término “agente insulínico” como se usa en la presente se refiere a un compuesto que es un agonista del receptor GLP-1 de humano, es decir, un compuesto que estimula la formación de cAMP en un medio apropiado que contiene el receptor GLP-1 de humano (uno de tales medios se describe a continuación). La potencia de un agente insulínico se determina calculando el valor EC_{50} de la curva de dosis-respuesta como se describe a continuación.

[0023] Las células de riñón de hámster bebé (BHK, por sus siglas en inglés) que expresan el receptor GLP-1 de humano clonado (BHK-467-12A) fueron cultivadas en medio DMEM con la adición de 100 IU/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin, 5 % de suero fetal de carnero y 0,5 mg/mL de Geneticin G-418 (Life Technologies). Las células se lavaron dos veces en solución salina amortiguada con fosfato y se cosecharon con Varsene. Las membranas de plasma se prepararon de las células por homogeneización con un Ultraturrax en el amortiguador 1 (HEPES-Na 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4). El homogeneizado se centrifugó a 48,000 x g durante 15 minutos a 4° C. El granulado se suspendió por homogeneización en el amortiguador 2 (HEPES-Na 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7.4), después se centrifugaron a 48,000 x g durante 15 minutos a 4° C. El procedimiento de lavado se repitió una vez más. El granulado final se suspendió en el amortiguador 2 y se usó inmediatamente para las pruebas o se almacenó a -80° C.

[0024] La prueba del receptor funcional se llevó a cabo midiendo AMP cíclica (cAMP) como una respuesta a la estimulación por el agente insulínico. cAMP formado se cuantificó por el Kit de cAMP AlphaScreen™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las incubaciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos de media área en un volumen total de 50 μL de amortiguador 3 (Tris-HCl 50 mM, HEPES 5 mM, MgCl_2 10 mM, pH 7.4) y con las siguientes adiciones: ATP 1 mM, GTP 1 μM , 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, Tween-20 al 0,01 %, BSA al 0,1 %, 6 μg de preparación de membrana, 15 $\mu\text{g/mL}$ de cuentas aceptadoras, 200 $\mu\text{g/mL}$ de cuentas donadoras preincubadas con biotilil-cAMP 6 nM. Los compuestos que van a probarse para la actividad agonista se disolvieron y diluyeron en el amortiguador 3. Se preparó frescamente GTP para cada experimento. La placa se incubó en la oscuridad con agitación lenta durante tres horas a temperatura ambiente seguido del conteo en el instrumento Fusion™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las curvas de concentración-respuesta se graficaron para los compuestos individuales y los valores EC_{50} se estimaron usando un modelo logístico de cuatro parámetros con Prism v. 4.0 (GraphPad, Carlsbad, CA).

[0025] El término “DPP-IV protegido” como se usa en la presente refiriéndose a un polipéptido, significa un polipéptido que se ha modificado químicamente para hacer tal compuesto resistente a la peptidasa dipeptidil aminopeptidasa-4 de plasma (DPP-IV). La enzima de DPP-IV en plasma se conoce que está involucrada en la degradación de diferentes hormonas peptídicas, por ejemplo, GLP-1, GLP-2, Exendina-4, etc. De esta manera, se está haciendo un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de polipéptidos susceptibles a la hidrólisis mediada por DPP-IV para reducir la tasa de degradación por DPP-IV. En una modalidad, un péptido protegido con DPP-IV es más resistente a DPP-IV que GLP-1(7-37) o Exendina-4(1-39).

[0026] La resistencia de un péptido a la degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina por la siguiente prueba de degradación:

Se incuban alícuotas del péptido (5 nmol) a 37° C con 1 μL de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada que corresponde a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 μL de amortiguador de 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 del péptido se separan y se cuantifican usando análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican en 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 una velocidad de flujo de 1 mL/min con gradientes de etapa por etapa lineales de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % (0 % de acetonitrilo durante 3 minutos, 0-24 % de acetonitrilo durante 17 minutos, 24-48 % de acetonitrilo durante 1 minuto) de acuerdo con Siegal *et al.*, Regul. Pept. 1999; 79:93-102 and Mentlein *et al.*, Eur. J. Biochem. 1993; 214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden monitorearse por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos) y se cuantifican por integración de sus áreas pico relacionadas con las de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un péptido por la dipeptidil aminopeptidasa IV se estima a los tiempos de incubación que resultarán en menos de 10 % del péptido que es hidrolizado.

[0027] El término “alquilo C_{1-6} ” como se usa en la presente se refiere a un grupo de hidrocarburo saturado, ramificado, lineal o cíclico que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, ter-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, ter-pentilo, n-hexilo, isohexilo, ciclohexano y similares.

- 5 [0028] El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente significa que es conveniente para las aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no da origen a eventos adversos en los pacientes, etc.
- 5 [0029] El término “excipiente” como se usa en la presente, se refiere a los compuestos químicos que normalmente se adicionan a las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, amortiguadores, agentes de tonicidad, conservadores y similares.
- 10 [0030] El término “cantidad efectiva” como se usa en la presente significa una dosificación que es suficiente para ser efectiva para el tratamiento del paciente comparado sin el tratamiento.
- 15 [0031] El término “composición farmacéutica” como se usa en la presente se refiere a un producto que comprende un compuesto activo o una sal del mismo, junto con los excipientes farmacéuticos, tal como amortiguador, conservador y opcionalmente, un modificador de tonicidad y/o un estabilizador. De esta manera, una composición farmacéutica también se conoce en la técnica como una formulación farmacéutica.
- 20 [0032] El término “tratamiento de una enfermedad” como se usa en la presente significa el manejo y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno, así como para aliviar los síntomas o las complicaciones asociadas con la enfermedad, condición o trastorno.
- 25 [0033] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un análogo de GLP-1 acilado que se puede unir a la albúmina y al receptor de GLP-1 de manera simultánea.
- 30 [0034] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un análogo de GLP-1 acilado que se puede unir al receptor de GLP-1 con una afinidad menor de 100 nM, preferentemente menor de 30 nM en presencia de 2 % de albúmina.
- 35 [0035] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un análogo de GLP-1 acilado cuya afinidad al receptor de GLP-1 se disminuye sólo parcialmente cuando se compara con la afinidad en presencia de una concentración muy baja (por ejemplo, 0,005 % a 0,2 %) de albúmina de humano a la afinidad en presencia de 2 % de albúmina de humano. El cambio en la afinidad de unión bajo estas condiciones es menor de 50 veces, preferentemente menor de 30 veces y más preferentemente menor de 10 veces.
- 40 [0036] El término “radical de unión de albúmina” como se usa en la presente significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina de suero de humano. El residuo de unión de albúmina enlazado al polipéptido terapéutico tiene por lo regular una afinidad menor de 10 μ M con respecto a la albúmina de suero de humano y preferiblemente menor de 1 μ M. Un intervalo de los residuos de unión de albúmina es conocido entre los radicales lipofílicos lineales y ramificados que contienen 4-40 átomos de carbono que tienen un grupo ácido distal.
- 45 [0037] El término “enlazador hidrofílico” como se usa en la presente significa un espaciador que separa un péptido y un residuo de unión de albúmina con un radical químico que comprende por lo menos 5 átomos que no son de hidrógeno, donde el 30-50 % de éstos son N u O.
- 50 [0038] El término “grupos ácidos” como se usa en la presente, significa grupos químicos orgánicos que están completa o parcialmente cargados negativamente en pH fisiológico. El valor pKa de tales grupos es menor de 7, preferentemente menor de 5. Esto incluye, pero no se limita a ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfóricos o sistemas de anillos heterocíclicos que están completa o parcialmente cargados negativamente a pH fisiológico.
- 55 [0039] La presente invención proporciona un análogo de GLP-1, acilado con un radical de unión de albúmina lipofílico, que contiene por lo menos dos grupos químicos ácidos enlazados por medio de un enlazador de aminoácido no natural a un residuo de lisina en la posición 37 o 38. En una modalidad de la invención, la lisina está en la posición 38.
- 60 [0040] La presente invención también proporciona un análogo de GLP-1 acilado, donde el análogo de GLP-1 se estabiliza contra DPP-IV por la modificación de por lo menos un residuo de aminoácido en las posiciones 7 y 8 con relación a la secuencia GLP-1(7-37) (SEC ID NO 1), y donde tal acilación es un diácido enlazado a un residuo de lisina en la posición 37 o 38 opcionalmente por medio de un enlazador hidrofílico de aminoácido no natural. En una modalidad de la invención la lisina está en la posición 38.
- [0041] La presente invención también proporciona un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1, caracterizado por la acilación del análogo de GLP-1 con un diácido en el residuo de lisina en la

posición 37 o 38 de tal análogo de GLP-1. En una modalidad de la invención la lisina está en la posición 38.

[0042] La presente invención también proporciona un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1 a más de aproximadamente 40 horas, caracterizado por modificar por lo menos uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 7 y 8 de un péptido GLP-1(7-37)Lys o un análogo del mismo y acilar el residuo Lys38 del aminoácido C-terminal del análogo de GLP-1 con un diácido por medio de un espaciador hidrofílico.

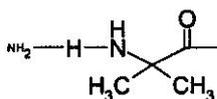
[0043] La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de acuerdo con la presente invención y con el uso de tales compuestos de acuerdo con la presente invención para preparar medicamentos para el tratamiento de una enfermedad.

[0044] En una modalidad de la invención tal análogo de GLP-1 es Aib⁸,Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)Lys,Aib^{8,22},Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)Lys o Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1-(7-37)Lys.

[0045] En la siguiente fórmula estructural II el radical U es un di-radical que puede ser enlazado a los grupos terminales B y el grupo amino del aminoácido de lisina en el péptido de dos maneras diferentes. En las modalidades de la invención la U en la fórmula II se enlaza con el grupo B enlazado al final de la cadena de alquilo y el péptido en el otro extremo.

[0046] En las siguientes fórmulas los enlaces terminales de los grupos enlazados van a considerarse como los enlaces de unión y que no terminan en grupos metileno, a menos que se establezca lo contrario.

[0047] En las siguientes fórmulas



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

[0048] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un análogo de GLP-1, acilado con un radical de unión de albúmina lipofílica que contiene por lo menos dos grupos químicos ácidos libres enlazados por medio de un enlazador de aminoácido no natural a un residuo de lisina en la posición 37 o 38. En una modalidad de la invención la lisina está en la posición 38.

[0049] En una modalidad, el término grupos químicos ácidos libres se entenderá que tiene el mismo significado que los "grupos ácidos" como se usa en la presente.

[0050] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un análogo de GLP-1 acilado, donde tal análogo de GLP-1 se estabiliza contra DPP-IV mediante la modificación de por lo menos un residuo de aminoácido en las posiciones 7 y 8 con relación a la secuencia GLP-1 (7-37) (SEC ID NO 1), y donde tal acilación es un diácido enlazado a un residuo de lisina en la posición 37 o 38 opcionalmente por medio de un enlazador hidrofílico de aminoácido no natural. En una modalidad de la invención la lisina está en la posición 38.

[0051] En una modalidad de la invención, un análogo de GLP-1 que tiene una modificación de por lo menos un residuo de aminoácido no proteogénico en las posiciones 7 y/u 8 con relación a la secuencia GLP-1 (7-37) (SEC ID NO 1), que se acila con un radical al residuo de lisina en la posición 37 o 38, y donde tal radical comprende por lo menos dos grupos ácidos, donde un grupo ácido se enlaza terminalmente. En una modalidad de la invención, la lisina está en la posición 38.

[0052] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con la modalidad anterior, donde el radical enlazado en la posición 37 o 38 comprende un enlazador hidrofílico. En una modalidad de la invención la lisina está en la posición 38.

[0053] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con las modalidades anteriores, donde el enlazador hidrofílico comprende por lo menos 5 átomos que no son de hidrógeno, donde 30-50 % de estos son N u O.

[0054] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el radical enlazado en la posición 37 o 38 comprende un radical de unión de albúmina separado del péptido por el enlazador hidrofílico. En una modalidad de la invención, la lisina está en la posición 38.

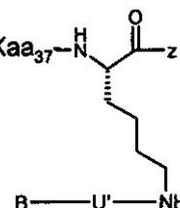
donde l es 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20;

[0057] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es un compuesto de la fórmula I (SEC ID NO 2):

5

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

Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-NH



Fórmula I

donde

Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, N^α-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina

10

Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, 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; Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

15

Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

20

Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;

Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃₃ es Val o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn o Arg;

25

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg; Gly o Lys o está ausente;

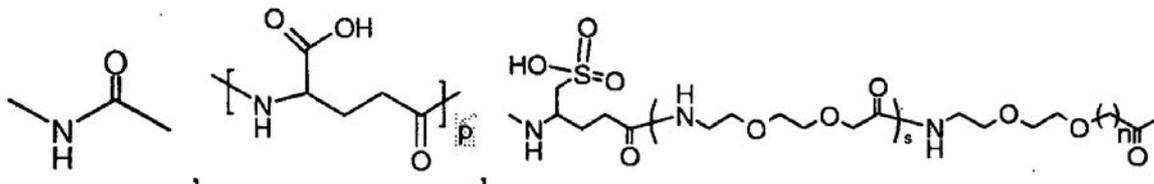
Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, Asn o está ausente.

[0058] Si Xaa₃₆ o Xaa₃₇ está ausente, el aminoácido C terminal es lisina como se establece en la fórmula anterior.

30

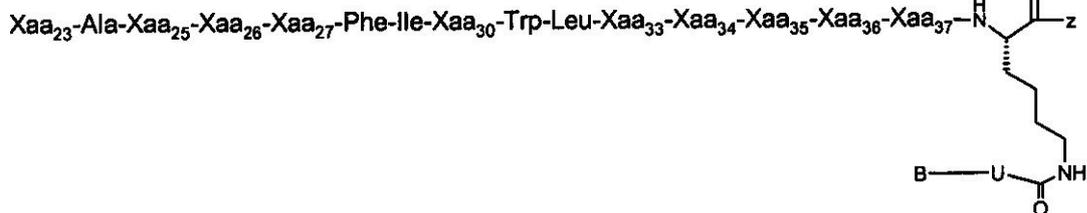
Z es OH o NH₂;

U' es un espaciador seleccionado de



[0060] En otra modalidad, la invención se relaciona con un compuesto de la fórmula II (SEC ID NO 3)

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



Fórmula II

[0061] La fórmula II es idéntica a la fórmula I como se establece en una modalidad anterior, donde el radical B-U se reemplaza por B-U'. Siendo únicamente la diferencia la incorporación el grupo carboxi en la U' con relación a U, que está sin el grupo carboxi unido.

5

[0062] En la fórmula II cada uno de las Xaa's tiene el siguiente significado:

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

10 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 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; Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

15 Xaa₂₀ es Leu o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;

20 Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃₃ es Val o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn o Arg;

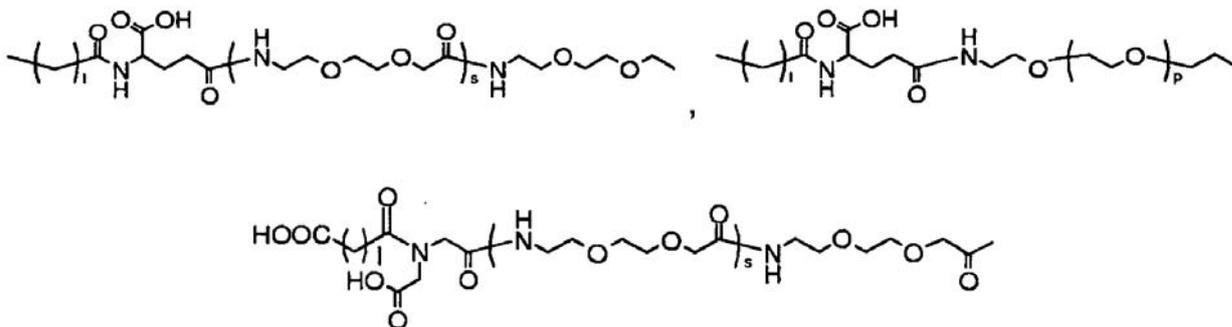
Xaa₃₅ es Gly o Aib;

25 Xaa₃₆ es Arg; Gly o Lys o está ausente;

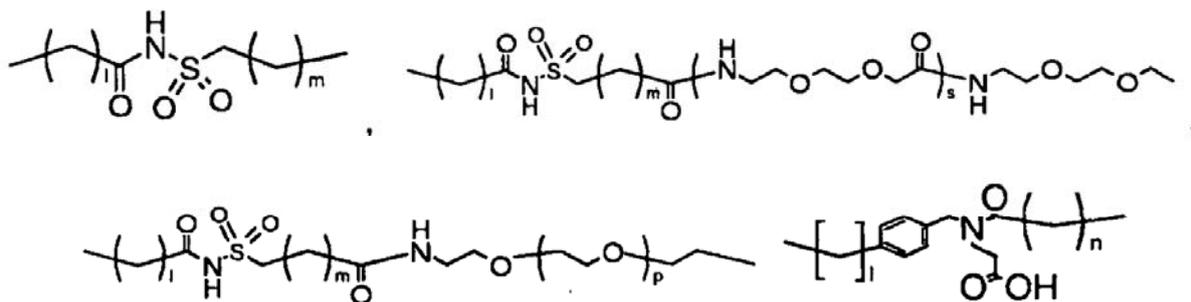
Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys o está ausente.

Z es OH o NH₂

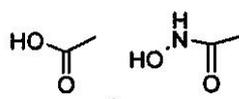
U es un espaciador seleccionado de



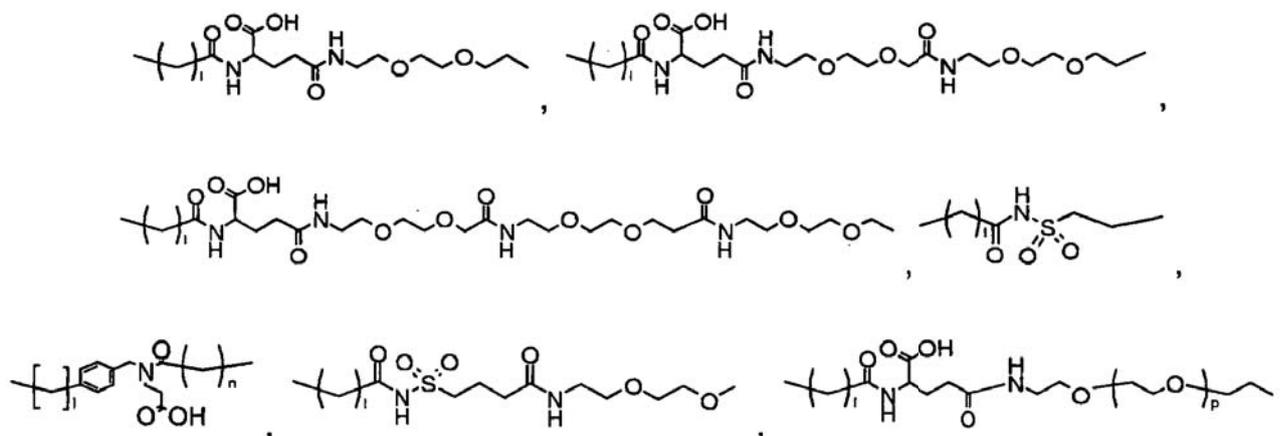
30



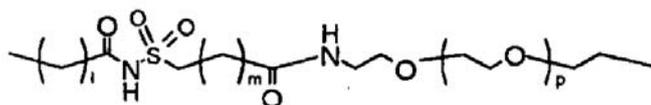
5 donde n es 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18
 l es 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18,
 m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6,
 s es 0, 1, 2 o 3,
 p es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23,
 B es un grupo ácido seleccionado de



[0063] En otra modalidad de la invención U es



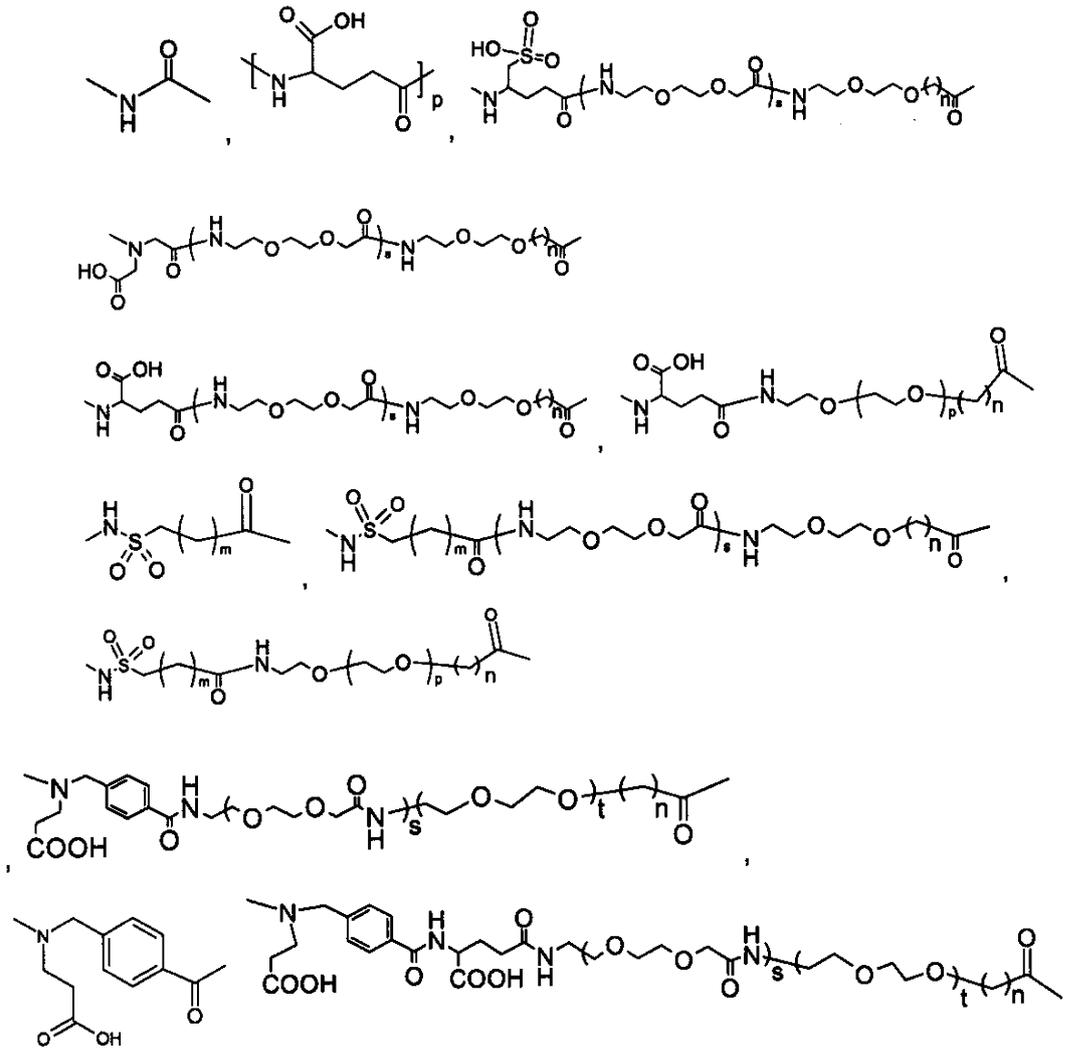
10 o



donde l es 14, 15 o 16
 n es 15, 16, 17 o 18,
 p es 3, 7, 11 o 24

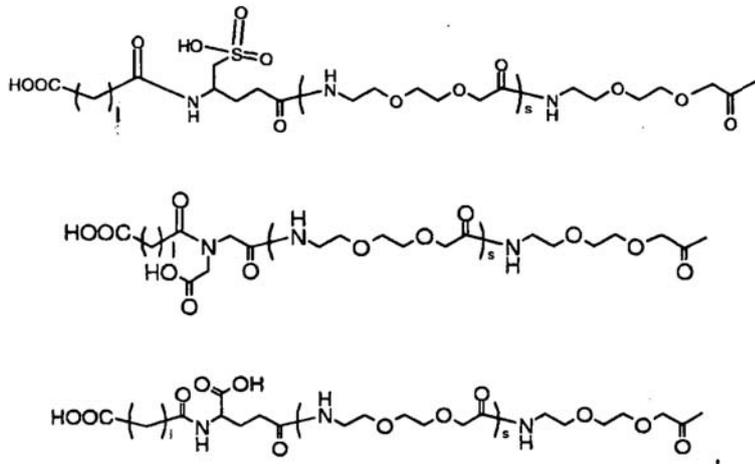
15 [0064] En las siguientes modalidades cuando se hace referencia a U' en la fórmula I se entenderá que también se refiere a la fórmula II y U, siendo la única diferencia el grupo carboxi.

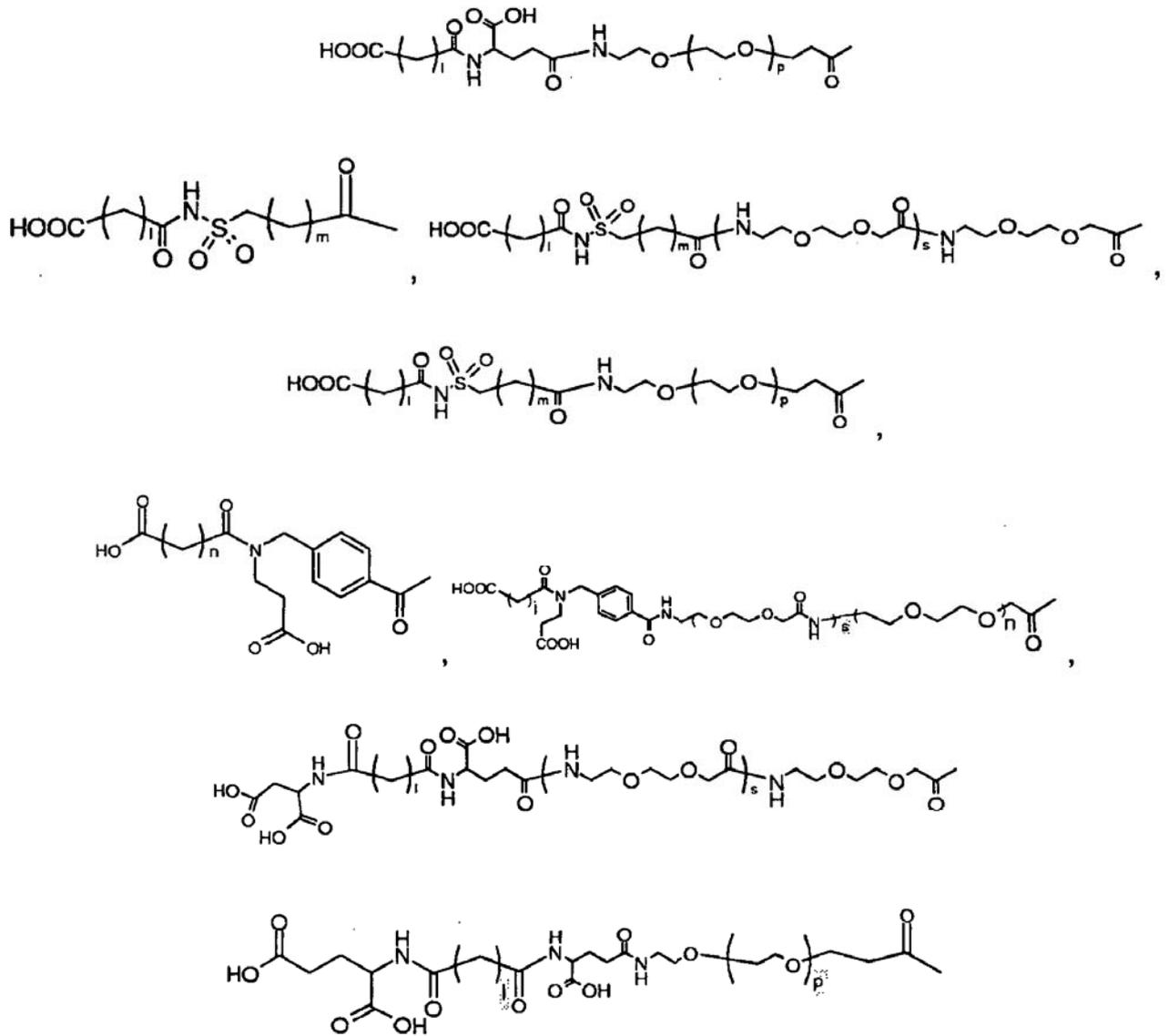
[0065] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con las modalidades anteriores, donde U' se selecciona de



m es 2, 3, 4 o 5,
 n es 1 o 2,
 s es 0, 1 o 2,
 t es 0, 1, 2 o 3
 p es 1, 2, 3, 4, 7, 11 o 23

[0066] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con las modalidades anteriores, donde B-U'- es





donde l es 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20;

p es 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

s es 0, 1 o 2

5 t es 0 o 1;

[0067] Una modalidad de acuerdo con lo anterior, donde

l es 14, 15, 16, 17 o 18

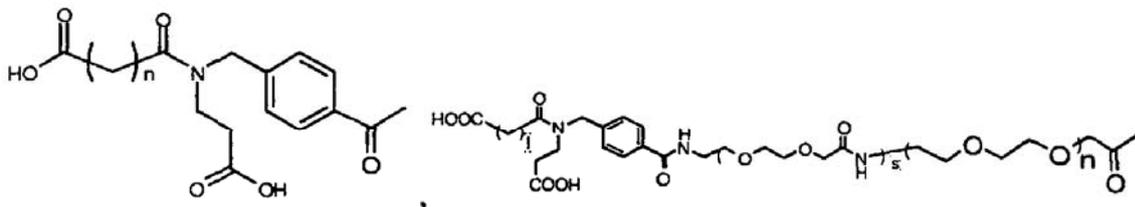
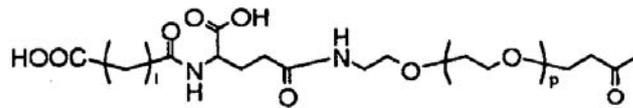
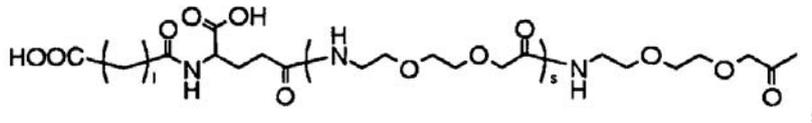
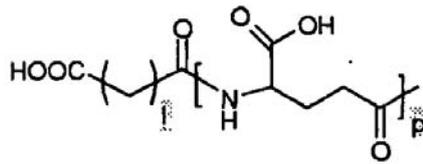
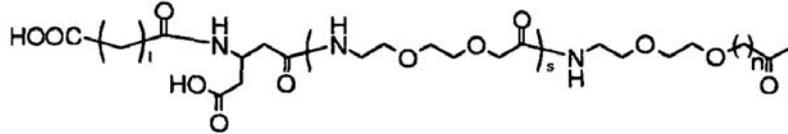
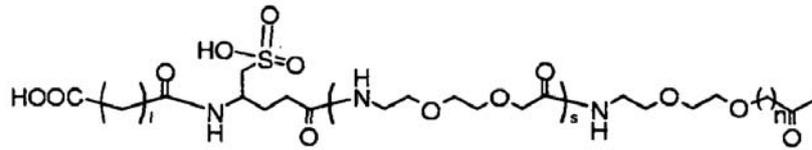
p es 1, 2, 3, 4 u 11;

10 s es 0, 1 o 2;

t es 0 o 1;

[0068] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con la modalidad anterior, donde B-U' es

15



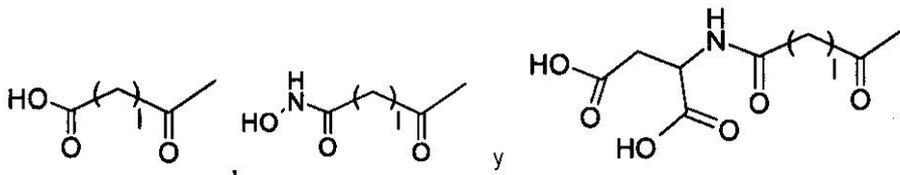
donde l es 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20;

p es 1, 2, 3 o 4.

s es 0, 1 o 2

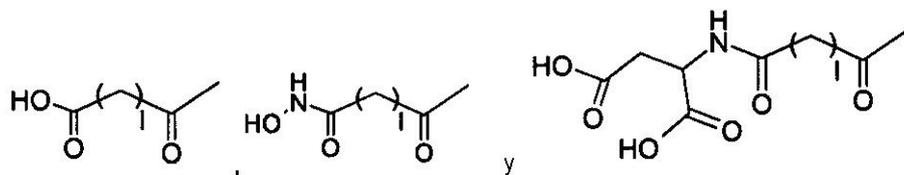
5 n es 0, 1 o 2

[0069] Una modalidad de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores es donde B es



y l es 14, 16, 18 o 20;

10 [0070] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde B es



donde l es 14, 15 o 16.

5 **[0071]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde s es 1.

[0072] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde n es 1.

10 **[0073]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde l es 14, 15 o 16; En las modalidades l es 17, 18, 19 o 20. En las modalidades l es 15, 16 o 17. En las modalidades l es 18, 19 o 20. En las modalidades l es 14. En las modalidades l es 16. En las modalidades l es 18. En las modalidades l es 20.

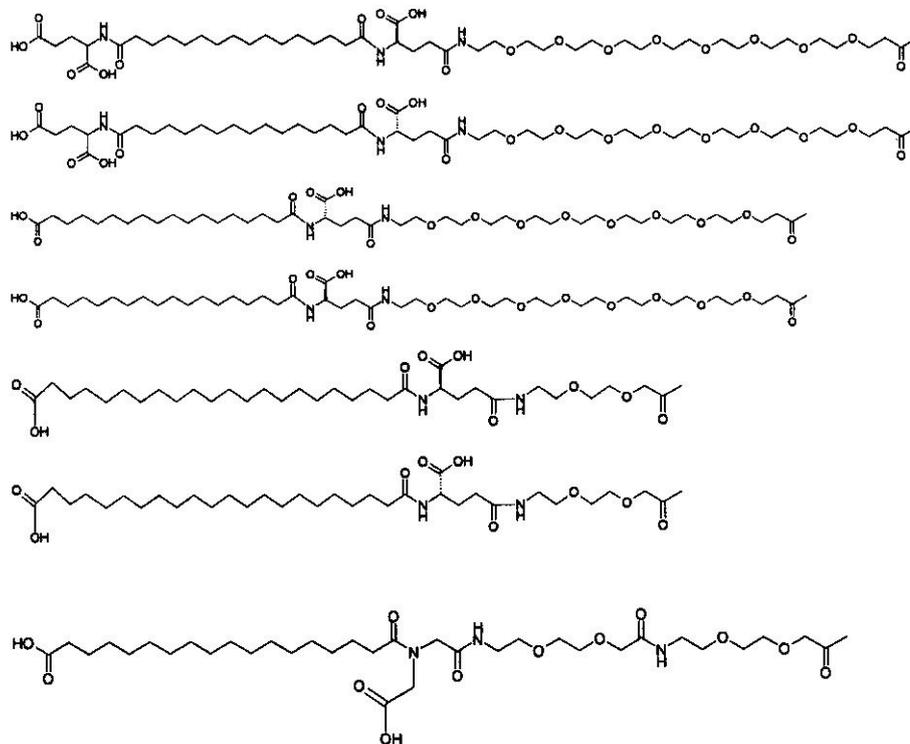
15 **[0074]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde p es 1.

20 **[0075]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde p es 2.

[0076] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde p es 3.

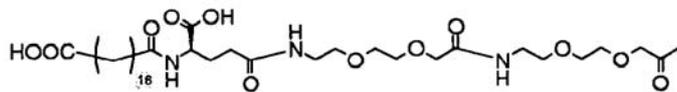
25 **[0077]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde p es 4.

[0078] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde B-U' es

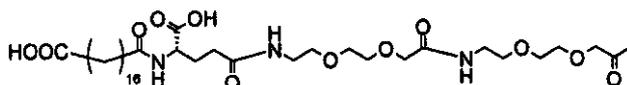


30

[0079] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde B-U' es



[0080] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde B-U' es



[0081] En otra modalidad de la invención, la fórmula I o la fórmula II se define por

Xaa₇ es His o desamino-histidina,

Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys o Aib; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib; Xaa₂₃ es Gln o Glu; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₆ es Lys o Arg; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala o Glu; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Lys o Arg; Xaa₃₅ es Gly o Aib; Xaa₃₆ es Arg, Lys o está ausente; Xaa₃₇ es Gly, Asn o está ausente; Z es OH o NH₂

[0082] En otra modalidad de la invención, la fórmula I o II se define por

Xaa₇ es His; Xaa₈ es Aib; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₆ es Arg; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Arg; Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Gly; Z es OH o NH₂;

[0083] En una modalidad de la invención

Xaa₇ es His; Xaa₈ es Aib; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₆ es Arg; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Arg; Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Asn; Z es OH o NH₂;

[0084] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende una modificación de la L-histidina N terminal en la posición 7 de la secuencia GLP-1 (7-37).

[0085] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con la modalidad anterior, donde el análogo de GLP-1 comprende imidazopropionilo⁷, α-hidroxi-histidina⁷ o N-metil-histidina⁷, D-histidina⁷, desamino-histidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β-hidroxi-histidina⁷, homohistidina⁷, N^α-acetil-histidina⁷, α-fluorometil-histidina⁷, α-metil-histidina⁷, 3-piridilalanina⁷, 2-piridilalanina⁷ o 4-piridilalanina⁷.

[0086] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende una sustitución de la L-alanina en la posición 8 de la secuencia de GLP-1(7-37) para otro residuo de aminoácido.

[0087] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende Aib⁸, Gly⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, 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.

[0088] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende Aib⁸;

[0089] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende no más de quince residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-1(7-37) (SEC ID NO: 1),

[0090] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde no más de diez residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-

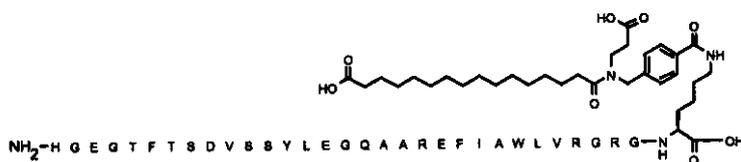
1(7-37) (SEC ID NO: 1).

5 **[0091]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende no más de seis residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-1 (7-37) (SEC ID NO. 1).

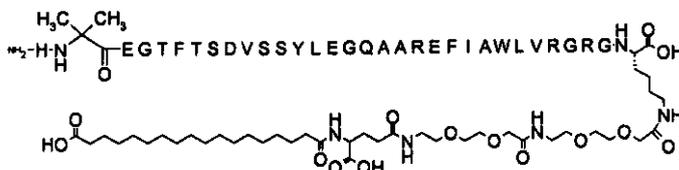
[0092] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende no más de 3 residuos de aminoácido que no se codifican por el código genético.

10 **[0093]** Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, donde el análogo de GLP-1 comprende solamente un residuo de lisina.

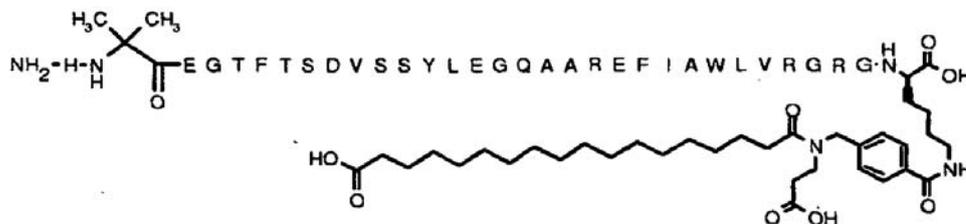
[0094] Una modalidad proporciona un análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es



15 el péptido Lys^{E38}((4-([N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil)benzoi)[Gly8;Arg26,34;Lys38]GLP-1-(7-37),



20 [Aib8,Arg26,34] GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil]-OH,



- [0095] En otra modalidad de la invención el diácido es un ácido carboxílico.
- [0096] En otra modalidad de la invención el grupo de acilación es un ácido alcan α,ω -dicarboxílico de cadena lineal o ramificada.
- 5 [0097] En otra modalidad de la invención el grupo de acilación tiene la estructura $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, donde n es de 12 a 20.
- 10 [0098] En otra modalidad de la invención el grupo de acilación tiene la 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 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$.
- [0099] En otra modalidad de la invención el grupo de acilación tiene la estructura $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$.
- 15 [0100] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende una modificación de la L-histidina N-terminal en la posición 7 de la secuencia de GLP-1 (7-37). Esta modificación confiere un aumento de estabilidad contra la degradación por la enzima DPPIV, por ejemplo, una estabilización de DPPIV.
- [0101] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende imidazopropionilo⁷, α -hidroxi-histidina⁷ o N-metil-histidina⁷.
- 20 [0102] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende D-histidina⁷, desamino-histidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β -hidroxi-histidina⁷, homohistidina⁷, N⁶-acetil-histidina⁷, α -fluorometil-histidina⁷, α -metil-histidina⁷, 3-piridilalanina⁷, 2-piridilalanina⁷ o 4-piridilalanina⁷.
- 25 [0103] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende una sustitución de la L-alanina en la posición 8 de la secuencia de GLP-1 (7-37) por otro residuo de aminoácido.
- [0104] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende Aib⁸, Gly⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸ o Thr⁸.
- 30 [0105] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende una sustitución de la L-alanina en la posición 8 de la secuencia GLP-1 (7-37) por el 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. En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende no más de quince
- 35 residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-1(7-37) (SEC ID NO 1) o no más de diez residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-1(7-37) (SEC ID NO 1).
- [0106] En aún otra modalidad de la invención, el análogo de GLP-1 comprende no más de seis residuos de aminoácido que se han intercambiado, adicionado o eliminado comparado con GLP-1 (7-37) (SEC ID NO 1).
- 40 [0107] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende no más de 3 residuos de aminoácido que no se codifican por el código genético.
- [0108] En otra modalidad de la invención el análogo de GLP-1 comprende solamente un residuo de lisina.
- 45 [0109] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1, caracterizado en que se acila el análogo de GLP-1 con un diácido en el residuo de lisina en la posición 37 o 38 del análogo de GLP-1.
- 50 [0110] En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1 a más de aproximadamente 40 horas, caracterizado porque se modifica por lo menos uno de los residuos de aminoácido en las posiciones 7 y 8 de un péptido de GLP-1(7-37)Lys o un análogo del mismo, y acilar el residuo de Lys38 de aminoácido C-terminal del análogo de GLP-1 con un diácido por medio de un espaciador hidrofílico.
- 55 [0111] Una modalidad proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una de las modalidades anteriores, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 [0112] Una modalidad proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad anterior, que es conveniente para la administración parenteral.

- [0113] Una modalidad proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores para la preparación de un medicamento.
- 5 [0114] Una modalidad proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia a la glucosa dañada, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad cardíaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares, ataque, síndrome de intestino inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 10 [0115] Una modalidad proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores para la preparación de un medicamento para el retraso o prevención de la progresión de una enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 15 [0116] Una modalidad proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β y/o para restaurar la sensibilidad a la glucosa a las células β .
- 20 [0117] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención que está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 25 mg/mL, y donde la formulación tiene un pH de 3.0 a 9.0. La formulación puede comprender además un sistema amortiguador, conservador(es), agente(s) de tonicidad, agente(s) de quelación, estabilizadores y surfactantes. En una modalidad de la invención la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende por lo menos 50 % p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende por lo menos 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende por lo menos 50 % p/p de agua.
- 25 [0118] En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelado, donde el médico o el paciente adicionan los solventes y/o diluyentes antes del uso.
- 30 [0119] En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación secada (por ejemplo, secada por congelado o secada por atomizado) lista para el uso sin ninguna disolución previa.
- 35 [0120] En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención, y un amortiguador, donde el compuesto está presente en una concentración de 0,1 mg/mL o más, y donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 9.0.
- 40 [0121] En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 9.5. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 7.0. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.5. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 9.0. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.5. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.5. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 7.0. En otra modalidad de la invención el pH de la formulación es de aproximadamente 8.0 a aproximadamente 8.5.
- 45 [0122] En una modalidad adicional de la invención el amortiguador se selecciona del grupo que consiste de acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato diácido de sodio, fosfato ácido de disodio, 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 amortiguadores constituye una modalidad alternativa de la invención.
- 50 [0123] En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende además un conservador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad adicional de la invención el conservador se selecciona del grupo que consiste de 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, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropan-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una modalidad el conservador es fenol o m-cresol. En una modalidad adicional de la invención el conservador está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a
- 60

20 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el conservador está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el conservador está presente en una concentración de 5 mg/mL a 10 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el conservador está presente en una concentración de 10 mg/mL a 20 mg/mL. Cada uno de estos conservadores específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un conservador en las composiciones farmacéuticas es bien conocido para la persona experimentada. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0124] En una modalidad adicional de la invención la formulación además comprende un agente isotónico. En una modalidad adicional de la invención el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propandiol (propilenglicol), 1,3-propandiol, 1,3-butandiol) polietilenglicol (por ejemplo PEG400) o mezclas de los mismos. En una modalidad, el agente de isotonicidad es propilenglicol. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una modalidad el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo de C4-C8 que tiene por lo menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una modalidad, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad usada, con tal de que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida o no afecte adversamente los efectos de estabilización usando los métodos de la invención. En una modalidad, la concentración del azúcar o alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 150 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/mL a 50 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/mL a 7 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 5 mg/mL a 7 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/mL a 24 mg/mL. En una modalidad 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 modalidad alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en las composiciones farmacéuticas es bien conocido para la persona experimentada. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0125] En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende además un agente de quelación. En una modalidad adicional de la invención el agente de quelación se selecciona de las sales del ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En una modalidad adicional de la invención, el agente de quelación está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención, el agente de quelación está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 2 mg/mL. En una modalidad adicional de la invención, el agente de quelación está presente en una concentración de 2 mg/mL a 5 mg/mL. Cada uno de estos agentes de quelación específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un agente de quelación en las composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experimentada. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0126] En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizador. El uso de un estabilizador en las composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experimentada. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

[0127] Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que exhibe posiblemente una formación de agregado durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregado" se entiende la interacción física entre las moléculas polipeptídicas que resulta en la formación de oligómeros, que puede permanecer soluble o en agregados visibles grandes que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición de formulación líquida o formulación una vez preparada, no se administra inmediatamente a un paciente. En vez de esto, la siguiente preparación, se envasa para el almacenamiento, ya sea en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma secada para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma apropiada para la administración a un paciente. Por "forma secada" se entiende la composición farmacéutica líquida o la formulación se seca por secado por congelado (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams and Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por atomización (ver Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed; 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 secado con aire (Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregado mediante un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de tal polipéptido, resultando en la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregado puede

causar otros problemas, tales como bloqueo del tubo, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

5 **[0128]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregado por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por “base de aminoácido” se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma salina. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, pueden estar presentes todos en sus formas salinas, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre, mientras que otros están presentes en sus formas salinas. En una modalidad, los aminoácidos para el uso en la preparación de las composiciones de la invención son los que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una mezcla de los mismos) de un aminoácido particular (por ejemplo, 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 de que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma salina. En una modalidad, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también pueden formularse con análogos de estos aminoácidos. Por “análogo de aminoácido” se entiende un derivado del aminoácido que se presenta naturalmente que porta aproximadamente el efecto deseado de la formación de agregado disminuido por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina apropiados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina apropiados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína apropiados 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 salina. En una modalidad adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración, que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

25 **[0129]** En una modalidad adicional de la invención, puede adicionarse metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o análogos de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que comprende por lo menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por “inhibir” se entiende la acumulación mínima de las especies oxidadas con metionina con el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina resulta en una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos. La cantidad que va a adicionarse debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina, de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Por lo regular, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de sulfóxido de metionina. En general, esto puede lograrse adicionando metionina de modo que la relación de metionina adicionada a los residuos de metionina oscile de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

40 **[0130]** En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una modalidad adicional de la invención el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de los mismos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

50 **[0131]** Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizadores adicionales, que mejoran además la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en el mismo. Los agentes estabilizadores de interés particular para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un surfactante no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con el congelado-descongelado o cizallamiento mecánico. En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende además un surfactante. En otra modalidad de la invención la composición farmacéutica comprende dos surfactantes diferentes. El término “surfactante” como se usa en la presente se refiere a cualesquiera moléculas o iones que están comprendidos de una parte soluble en agua (hidrofílica), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipofílica). Los surfactantes se acumulan preferentemente en las interfases, cuya parte hidrofílica se orienta hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia la fase aceitosa o hidrofóbica (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la que los surfactantes comienzan a formar micelas se conoce como la concentración de micela crítica o CMC. Además, los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes también se conocen como compuestos anfipáticos. El término “detergente” es un sinónimo usado para los surfactantes en general.

60 **[0132]** Los surfactantes aniónicos pueden seleccionarse del grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal de sodio del ácido

quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, metil éster del ácido desoxicólico, Digitonina, Digitoxigenina, N-óxido de N,N-Dimetildodecilamina, Docusato sódico, ácido glicodenodesoxicólico sódico, ácido glicocólico hidratado, ácido glicodesoxicólico monohidratado, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal disódica de 3-sulfato del ácido glicolítico, etil éster del ácido glitolítico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, Lugol, sal de sodio del ácido 1-octansulfónico, sal de sodio del ácido 1-octansulfónico, 1-butansulfonato de sodio, 1-decansulfonato de sodio, 1-dodecansulfonato de sodio, 1-heptansulfonato de sodio, 1-heptansulfonato de sodio, 1-nonansulfonato de sodio, 1-propansulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetansulfonato de sodio, colato de sodio hidratado, bilis de buey u oveja, colato de sodio hidratado, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexansulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentansulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal de sodio del ácido tauroquenodesoxicólico, sal de sodio del ácido taurodesoxicólico monohidratado, sal disódica de 3-sulfato del ácido tauroglítico, sal de sodio del ácido taurodesoxicólico, dodecil sulfato de Trizma[®], DSS (docusato sódico, registro CAS no. [577-11-7]), docusato cálcico, registro CAS no. [128-49-4], docusato potásico, registro CAS no. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), Dodecilsulfocolina (FOS-colina-12), Decilsulfocolina (FOS-Colina-10), Nonilsulfocolina (FOS-Colina-9), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico.

[0133] Los surfactantes catiónicos pueden seleccionarse del grupo de: bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de dodeciltildimetilamonio, 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.

[0134] Los surfactantes no iónicos pueden seleccionarse del grupo que consiste de: BigCHAP, Bis(polietilenglicol bis[imidazolil carbonil]), copolímeros de bloque como copolímeros de bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, tales como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij[®] 35, Brij[®] 56, Brij[®] 72, Brij[®] 76, Brij[®] 92V, Brij[®] 97, Brij[®] 58P, Cremophor[®] EL, decaetilen glicol monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, alquil-poliglucósidos, aceite de ricino etoxilado, Heptaetilen glicol monododecil éter, Heptaetilen glicol monododecil éter, Heptaetilen glicol monododecil éter, hexaetilen glicol monododecil éter, hexaetilen glicol monohexadecil éter, Hexaetilen glicol monooctadecil éter, Hexaetilen glicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, Nonaetilen glicol monododecil éter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, Octaetilen glicol monododecil éter, Octaetilen glicol monododecil éter, Octaetilen glicol monohexadecil éter, Octaetilen glicol monooctadecil éter, Octaetilen glicol monotetradecil éter, Octil-β-D-glucopiranosido, Pentaetilen glicol monododecil éter, Pentaetilen glicol monododecil éter, Pentaetilen glicol monohexadecil éter, Pentaetilen glicol monohexil éter, Pentaetilen glicol monooctadecil éter, Pentaetilen glicol monoocil éter, Polietilenglicol diglicidil éter, Polietilenglicol éter W-1, Polioxietileno 10 tridecil éter, Estearato de polioxietileno 100, Polioxietileno 20 isohexadecil éter, Polioxietileno 20 oleil éter, Estearato de polioxietileno 40, Estearato de polioxietileno 50, Estearato de polioxietileno 8, Polioxietileno bis(imidazolil carbonil), Propilenglicol estearato de polioxietileno 25, Saponina de corteza de Quillaja, Span[®] 20, Span[®] 40, Span[®] 60, Span[®] 65, Span[®] 80, Span[®] 85, Tergitol, 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, Tipo NP-9, Tetradecil-β-D-maltósido, Tetraetilenglicol monododecil éter, Tetraetilenglicol monododecil éter, Tetraetilenglicol monotetradecil éter, Trietilenglicol monododecil éter, Trietilenglicol monododecil éter, Trietilenglicol monohexadecil éter, Trietilenglicol monooctadecil éter, Trietilenglicol monotetradecil éter, 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, solución de Triton[®] X-165, solución de Triton[®] X-305, 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 esfingoglucolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos y/o n-Undecil β-D-glucopiranosido.

[0135] Los surfactantes zwitteriónicos pueden seleccionarse del grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3-(Decildimetilamonio)propansulfonato, sal interna de 3-(Dodecildimetilamonio)-propansulfonato, sal interna de 3-(Dodecildimetilamonio)propansulfonato, sal interna de 3-(N,N-Dimetilmiristilamonio)propansulfonato, 3-(N,N-Dimetiloctadecilamonio)-propansulfonato, sal interna de 3-(N,N-Dimetiloctilamonio)propansulfonato, 3-(N,N-Dimetilpalmitilamonio)propansulfonato, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propansulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propansulfonato, Dodecilsulfocolina, lisofosfatidilcolina de miristoilo, Zwittergente 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato), Zwittergente 3-10 sal interna de (3-(Decildimetilamonio)-propansulfonato), Zwittergente 3-08 (3-(Octildimetilamonio)pro-pansulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, kefalinas, fosfatidil serina), gliceroglucolípidos, (galactopiranosido), derivados de alquil, alcoxil (alquil éter), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, esto es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^{beta}-acilados de lisina, arginina o

5 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 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propansulfonato, surfactantes monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), lisofosfatidil-L-serina de palmitoilo, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) o mezclas de los mismos.

10 **[0136]** El término "alquil-poliglucósidos" como se usa en la presente se refiere a una cadena de alquilo, alqueno o alquínilo C₅₋₂₀, lineal o ramificada que está sustituida por uno o más radicales de glucósido, tales como maltósido, sacárido, etc. Las modalidades de estos alquil-poliglucósidos incluyen alquil-poliglucósidos C₆₋₁₈. Las modalidades específicas de estos alquil-poliglucósidos incluyen las cadenas de carbono de numeración uniforme, tal como una cadena de alquilo C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Las modalidades específicas de los radicales de glucósidos incluyen piranósido, glucopiranósido, maltósido, maltotriósido y sacarosa. En las modalidades de la invención, menos de 6 radicales glucósidos se enlazan al grupo alquilo. En las modalidades de la invención, menos de 5 radicales glucósidos se enlazan al grupo alquilo. En las modalidades de la invención, menos de 4 radicales glucósidos se enlazan al grupo alquilo. En las modalidades de la invención, menos de 3 radicales glucósidos se enlazan al grupo alquilo. En las modalidades de la invención, menos de 2 radicales glucósidos se enlazan al grupo alquilo. Las modalidades específicas de los alquil-poliglucósidos son glucósidos de alquilo tales como β-D-glucopiranósido de n-decilo, β-D-maltopiranósido de decilo, β-D-glucopiranósido de dodecilo, β-D-maltósido de n-dodecilo, β-D-maltósido de n-dodecilo, β-D-maltósido de n-dodecilo, β-D-glucopiranósido de tetradecilo, β-D-maltósido de decilo, β-D-maltósido de hexadecilo, β-D-maltotriósido de decilo, β-D-maltotriósido de dodecilo, β-D-maltotriósido de tetradecilo, β-D-maltotriósido de hexadecilo, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa.

25 **[0137]** El uso de un surfactante en las composiciones farmacéuticas es bien conocido para la persona experimentada. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

30 **[0138]** En una modalidad adicional de la invención, la formulación además comprende inhibidores de proteasa, tales como EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) y benzamidina-HCl, pero también pueden usarse otros inhibidores de proteasa comercialmente disponibles. El uso de un inhibidor de proteasa es particularmente útil en las composiciones farmacéuticas que comprenden cimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

35 **[0139]** 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, emulsificantes, antioxidantes, agentes volumétricos, modificadores de tonicidad, agentes de quelación, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica de humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido, tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar adversamente la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

40 **[0140]** Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente en necesidad de tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y mucosa, en sitios con absorción de desviación (bypass), por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que involucran absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen. La administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo a través de diferentes rutas de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmico, dérmico, transdérmico, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes en necesidad de tal tratamiento.

50 **[0141]** Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, pomadas, pastas, emplastos, ungüentos, tabletas, tabletas recubiertas, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina suave, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizaciones, polvos, aerosoles, inhaladores, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución en inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, colocación *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión e implantes.

60 **[0142]** Las composiciones de la invención pueden estar compuestas además de, o enlazarse, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, un vehículo de fármaco, un sistema de liberación de fármaco y un sistema de liberación de fármaco avanzado para mejorar adicionalmente la estabilidad del compuesto de la presente

invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr una cronoterapia bien conocida para los experimentados en la técnica y aumentar la obediencia del paciente o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de los vehículos, sistemas de liberación de fármacos y sistema avanzado de liberación de fármacos incluyen, pero no se limitan a, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, 5 dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol poli(vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo, sistemas co-poliméricos de bloque bien conocidos para los experimentados en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos para los experimentados en la técnica del 10 comportamiento de fase en los sistemas de lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, auto-emulsificación, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

[0143] Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar de los compuestos de la presente invención, usando, por ejemplo, un 15 inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos dispositivos bien conocidos para los experimentados en la técnica.

[0144] Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de liberación de fármacos controlada, prolongada, extendida, retardada y lenta. Más específicamente, pero no se limitan a, 20 composiciones que son útiles en la formulación de sistemas de liberación prolongada y liberación controlada parenteral (ambos sistemas conducen a una reducción de muchas veces en el número de administraciones), bien conocidos por los experimentados en la técnica. Aún más preferentemente, son los sistemas de liberación prolongada y controlada administrados subcutáneamente. Sin limitar el alcance de la invención, ejemplos del sistema de liberación controlada útil y las composiciones son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, 25 nanopartículas. Los métodos para producir los sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de solvente 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, New York, 2000) y Drug and Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

[0145] La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o 35 intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a pluma. De manera alternativa, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o una suspensión o un polvo para la administración del compuesto de la presente invención en la forma de una atomización nasal o líquido pulmonar o polvo. Como una opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante una inyección sin aguja o de un parche, opcionalmente un parche iontoforético o 40 transmucosa, por ejemplo, administración bucal.

[0146] Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse por vía de la ruta pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco usando cualquiera de los tipos conocidos de los dispositivos 45 apropiados para la liberación de fármacos pulmonares. Ejemplos de estos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generación en aerosol para la liberación de fármacos pulmonares, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medida, o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

[0147] Con base en la metodología de prueba estandarizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define 50 como el diámetro equivalente geométrico de una partícula esférica estándar de referencia de una densidad unitaria (1 g/cm^3). En el caso más simple, para las partículas esféricas, d_a se relaciona con un diámetro de referencia (d) como una función de la raíz cuadrada de la relación de densidad como se describe por:

Modificaciones de esta relación tienen lugar para partículas no esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. 55 Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" son bien descritos y conocidos en la técnica (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R and represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico de mediana másico (MMAD, por sus siglas en inglés) y el diámetro aerodinámico efectivo de mediana másico (MMEAD, por sus siglas en inglés) se usan de manera intercambiable, son parámetros estadísticos, y describen 60 empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol con relación a su potencial para depositarse en los pulmones,

independiente de la forma, tamaño o densidad real (cf. 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). MMAD se calcula normalmente de la medición hecha con impactores, un instrumento que mide el comportamiento de la inercial de partículas en el aire.

5

[0148] En una modalidad adicional, la formulación puede aerosolizarse por cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para lograr un MMAD de partículas de aerosol menor de 10 μm , más preferentemente entre 1-5 μm y más preferentemente entre 1-3 μm . El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más efectivo para la liberación del fármaco a la parte profunda del pulmón, donde la proteína se absorbe óptimamente (cf. 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).

10

[0149] La deposición pulmonar profunda de las formulaciones pulmonares que comprenden el compuesto de la presente invención puede optimizarse adicionalmente usando las modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero no se limitan a: flujo de inhalación lenta (por ejemplo, 30 L/min), retención de la respiración y tiempo de accionamiento.

15

[0150] El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

20

[0151] El término "estabilidad física" de la formulación proteínica como se usa en la presente se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente activos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a esfuerzos termo-mecánicos e/o interacción con las interfases y superficies que están desestabilizadas, tales como las superficies e interfases hidrofóbicas. La estabilidad física de las formulaciones de proteínas acuosas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la formulación llenada en recipientes apropiados (por ejemplo, cartuchos o ampollitas) a esfuerzo mecánico/físico (por ejemplo agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz enfocada intensa con un 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 muestra turbidez corresponde a un registro visual 0, y una formulación que muestra turbidez visual en la luz del día corresponde a un registro visual de 3). Una formulación se clasifica inestable física con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra una turbidez visual en la luz del día. De manera alternativa, la turbidez de la formulación puede evaluarse por las mediciones simples de la turbidez bien conocidas para la persona experimentada. La estabilidad física de las formulaciones de la proteína acuosa también puede evaluarse usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de la sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura de la proteína es Tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrilos amiloideos. En presencia de fibrilos y quizá también otras configuraciones de proteínas, la Tioflavina T da origen a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína de fibrilar. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

25

30

35

40

[0152] Otras moléculas pequeñas pueden usarse como sondas de los cambios en la estructura de la proteína de los estados nativo a no nativo. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrofóbico" se unen por preferencia a los parches hidrofóbicos expuestos de una proteína. Los parches hidrofóbicos en general se introducen dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero llegan a exponerse conforme una proteína comienza a desdoblarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares, pequeñas son los colorantes aromáticos, hidrofóbicos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de cobalto metálico de aminoácidos hidrofóbicos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina o similares.

45

50

[0153] El término "estabilidad química" de la formulación proteínica como se usa en la presente se refiere a los cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con propiedades de potencia biológica menos potencial e/o inmunogénicas potenciales aumentadas, comparado con la estructura de la proteína nativa. Pueden formarse diferentes productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y el ambiente al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química puede, más probablemente, no evitarse completamente y a menudo se observan cantidades aumentadas de los productos de degradación química durante el almacenamiento, y el uso de la formulación de proteína como es bien conocido por la persona experimentada en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que el grupo amida de la cadena lateral en los residuos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradaciones involucra la formación de los productos de transformación de alto peso molecular, donde dos o más moléculas de proteína se enlazan covalentemente entre sí por medio de transamidación y/o interacciones de disulfuro, que conducen a la formación de productos de degradación de un dímero,

55

60

- oligómero y polímero enlazados covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína puede evaluarse midiendo la cantidad de los productos de degradación química a diferentes intervalos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de los productos de degradación a menudo puede acelerarse, por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño molecular y/o la carga, usando diferentes técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).
- 5
- 10 **[0154]** Por esto, como se representó anteriormente, una “formulación estabilizada” se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y almacenamiento (de acuerdo con las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que se alcance la fecha de expiración.
- 15 **[0155]** En una modalidad 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.
- 20 **[0156]** En otra modalidad 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.
- [0157]** En otra modalidad 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.
- 25 **[0158]** En aún una modalidad 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.
- [0159]** En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.
- 30 **[0160]** En una modalidad, un compuesto de acuerdo con la invención se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia a la glucosa dañada, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad cardíaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares, síndrome de intestino inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 35 **[0161]** En otra modalidad, un compuesto de acuerdo con la invención se usa para la preparación de un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 40 **[0162]** En otra modalidad, un compuesto de acuerdo con la invención se usa para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de las células β y la masa de células β y/o para restaurar la sensibilidad a la glucosa a las células β .
- 45 **[0163]** El tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención también puede combinarse con una segunda o más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensión, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones que resultan de, o se asocian con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de las complicaciones y trastornos que resultan de, o se asocian con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinuros, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas involucradas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la absorción de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de lípidos, tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), Polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que disminuyen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinuro, repaglinuro; bloqueadores β , tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima de conversión de angiotensina), tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal de calcio, tales como nifedipina, felodipina, nicaidipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil y bloqueadores α , tales como doxazosin, urapidil, prazosin y terazosin; agonistas de CART (transcripción regulada por la anfetamina cocaína), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonista de PYY, agonistas de PYY2, agonistas de PYY4, agonistas mezclados de PYY2/PYY4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión del factor de liberación de corticotropina), agonistas de urocortina, antagonistas de β 3,
- 60

agonistas de MSH (hormona de estimulación de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona de concentración de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos de serotonina y noradrenérgicos mezclados, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona de crecimiento, compuestos de liberación de la hormona de crecimiento, agonistas de TRH (hormona de liberación de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3

[0164] (proteína de desacoplamiento 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas de TR β ; antagonistas de histamina H3, agonistas o antagonistas polipeptídicos inhibidores gástricos (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina.

[0165] El tratamiento con un compuesto de acuerdo con esta invención también puede combinarse con la cirugía - una cirugía que influye en los niveles de glucosa y/o la homeostasis de lípidos, tales como bandedo gástrico y desviación gástrica.

[0166] Debería entenderse que cualquier combinación apropiada de los compuestos de acuerdo con la invención con uno o más de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales, se considera que está dentro del alcance de la presente invención.

[0167] La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que, sin embargo, no se van a elaborar como para limitar el alcance de protección. Las características descritas en la descripción anterior y en los siguientes ejemplos pueden, separadamente o en cualquier combinación de las mismas, ser el material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

EJEMPLOS

[0168] Abreviaciones usadas:

| | |
|--------------------|--|
| r.t. | Temperatura ambiente |
| DIEA | diisopropiletilamina |
| H ₂ O | agua |
| CH ₃ CN | acetonitrilo |
| DMF | NN dimetilformamida |
| HBTU | hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio |
| Fmoc | 9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilo |
| Boc | ter butoxycarbonilo |
| OtBu | ter butil éster |
| tBu | terbutilo |
| Trt | trifenilmetilo |
| Pmc | 2,2,5,7,8-Pentametil-croman-6-sulfonilo |
| Dde | 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo |
| ivDde | 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutilo |
| Mtt | 4-metiltrilito |
| Mmt | 4-metoxitritilo |
| DCM | diclorometano |
| TIS | triisopropilsilano) |
| TFA: | ácido trifluoroacético |
| Et ₂ O: | éter dietílico |
| NMP | 1-metil-pirrolidin-2-ona |
| DIPEA: | diisopropiletilamina |
| HATU: | Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio |
| HOAt: | 1-hidroxi-7-azabenzotriazol |
| HOBt: | 1-hidroxibenzotriazol |
| DIC: | diisopropilcarbodiimida |

A: Síntesis del péptido unido a la resina.

[0169] La resina peptidilo protegida se sintetizó de acuerdo con la estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 en una escala de 0,25 mmol o 1,0 mmol usando los protocolos FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean acoplamiento mediados por HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-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 monitoreo UV de la desprotección del grupo de protección Fmoc. La resina iniciadora usada para la

síntesis de las amidas peptídicas de GLP-1 fue la resina de amida de Rink y la resina de Wang o clorotrilto se usó para los péptidos de GLP-1 con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos Fmoc estándares (suministrados de, por ejemplo, Anaspec o Novabiochem) proporcionados en cartuchos pre-pesados apropiados para el sintetizador AB1433A con la excepción de los aminoácidos no naturales, tales como Fmoc-Aib-OH (ácido Fmoc-aminoisobutírico). El aminoácido N terminal se protegió con Boc en el grupo amino alfa (por ejemplo, Boc-His(Boc)OH se usó para los péptidos con His en N-terminal). El grupo amino epsilon de la lisina en la posición 37 o 38 se protegió ya sea con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la ruta de unión del radical de unión de albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede, en algunos casos, mejorarse mediante el uso de dipéptidos protegidos en el enlace de amida dipeptídico con un grupo que puede dividirse bajo condiciones ácidas, tales como, pero no se limitan a 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos donde está presente una serina o una treonina en el péptido, puede hacerse uso de los dipéptidos de pseudoprolina (ver, por ejemplo, el catálogo de Novobiochem 2002/2003 o la versión más nueva, o W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403.

15 Procedimiento para la remoción de la protección de ivDde o Dde.

[0170] La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato agitador/filtración manual y se trató con 2 % de hidrazina en N-metil pirrolidona (20 mL, 2 x 12 min) para remover el grupo Dde o ivDde y se lavó con N-metil pirrolidona (4 x 20 mL).

20 Procedimiento para la remoción de la protección Mtt o Mmt.

[0171] La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato agitador/filtración manual y se trató con 2 % de TFA y 2-3 % de TIS en DCM (20 mL, 5-10 min repetido 6-12 veces) para remover el grupo Mtt o Mmt y se lavó con DCM (2 x 20 mL), MeOH al 10 % y DIPEA al 5 % en DCM (2 x 20 mL) y N-metil pirrolidona (4 x 20 mL).

25 Procedimiento para la unión de las cadenas laterales al residuo de lisina.

[0172] El residuo de unión de albúmina (cadena lateral de B-U- de la fórmula I) puede unirse al péptido de GLP-1 ya sea por acilación al péptido unido a la resina o acilación en solución al péptido no protegido, usando el reactivo de acilación estándar, tal como, pero no se limita a, DIC, HOBt/DIC, HOAt/DIC o HBTU.

30 Unión del péptido enlazado a la resina:

Ruta I

35 **[0173]** El residuo de unión de albúmina activado (éster activo o anhídrido asimétrico) (cadena lateral de B-U- de la fórmula I), tal como mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster del ácido octadecandioico (Ebashi et al., EP511600, 4 equivalentes molares con relación al péptido enlazado a la resina) se disolvió en NMP (25 mL), se adicionó a la resina y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó extensivamente con NMP, diclorometano, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

40 Ruta II

45 **[0174]** El residuo de unión de albúmina (cadena lateral de B-U- de la fórmula I) se disolvió en N-metil pirrolidona/cloruro de metileno (1:1, 10 mL). El reactivo de activación tal como hidroxibenzotriazol (HOBt) (4 equivalentes molares con relación a la resina) y diisopropilcarbodiimida (4 equivalentes molares con relación a la resina) se adicionó y la solución se agitó durante 15 minutos. La solución se adicionó a la resina y se adicionó diisopropiletilamina (4 equivalentes molares con relación a la resina). La resina se agitó 2 a 24 horas a 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).

50 Ruta III

55 **[0175]** El residuo de unión de albúmina activado (éster activo o anhídrido asimétrico) (cadena lateral de B-U- de la fórmula I), tal como mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster del ácido octadecandioico (Ebashi et al., EP511600, 1-1,5 equivalentes molares con relación al péptido de GLP-1, se disolvió en acetonitrilo (1 mL) y se adicionó a una solución del péptido en agua (10-20 mL) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de proteger los grupos sobre el residuo de unión de albúmina, tal como *ter*-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó O/N y el péptido crudo aislado se disolvió en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5) y se dejó en reposo durante 30 minutos, se evaporó *in vacuo* y por HPLC preparativa.

60 **[0176]** Procedimiento para la remoción de la protección de Fmoc: La resina (0,25 mmol) se colocó en un matraz de filtración en un aparato de agitación manual 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 piperidina al 20 % en N-metil pirrolidona (3 x 20 mL, 10 min cada una). 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).

5 Procedimiento para dividir el péptido de la resina:

[0177] El péptido se dividió de la resina por agitación durante 180 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (95:2.5:2.5 a 92:4:4). La mezcla dividida se filtró y el filtrado se concentró hasta un aceite mediante una corriente de nitrógeno. El péptido crudo se precipitó de este aceite con 45 mL de éter dietílico y se lavó 1 a 3 veces con 45 mL de éter dietílico.

[0178] Purificación: El péptido crudo se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 20 mm x 250 mm empacada con sílice C-18 de 5 μ o 7 μ . Dependiendo del péptido se usaron uno o dos sistemas de purificación.

[0179] TFA: Después de secar el péptido crudo se disolvió en 5 mL de ácido acético al 50 % y H₂O y se diluyó a 20 mL con H₂O y se inyectó en una columna que después se eluyó con un gradiente de 40-60 % de CH₃CN en TFA al 0,1 % de 10 mL/min durante 50 minutos a 40° C. Las fracciones que contienen el péptido se colectaron. El péptido purificado se liofilizó después de la dilución del eluato con agua.

[0180] Sulfato de amonio: La columna se equilibró con 40 % de CH₃CN en (NH₄)₂SO₄ 0.05 M, que se ajustó a pH 2.5 con H₂SO₄ concentrado. Después del secado, el péptido crudo se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50 % y H₂O y se diluyó a 20 mL con H₂O y se inyectó en la columna que después se eluyó con un gradiente de 40-60 % de CH₃CN en (NH₄)₂SO₄ 0.05 M, pH 2.5 a 10 mL/min durante 50 minutos a 40° C. Las fracciones que contienen el péptido se colectaron y se diluyeron con 3 volúmenes de H₂O y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak[®] C18 (Waters parte #:51910) que se ha equilibrado con TFA al 0,1 %. Después se eluyó con 70% de CH₃CN que contiene TFA al 0,1 % y el péptido purificado se aisló por liofilización después de la dilución del eluato con agua.

[0181] El producto final obtenido se caracterizó por RP-HPLC analítica (tiempo de retención) y por LCMS.

[0182] El análisis de RP-HPLC se realizó usando detección UV a 214 nm y una columna de sílice C-18 Vydac 218TP54 de 4,6 mm x 250 mm 5 μ (The Separations Group, Hesperia, USA) que se eluyó a 1 mL/min a 42° C. Se usaron dos diferentes condiciones de elución:

A1: Equilibrio de la columna en un amortiguador que consiste de (NH₄)₂SO₄ 0,1M, que se ajustó a pH 2.5 con H₂SO₄ concentrado y la elución mediante un gradiente de 0 % a 60 % de CH₃CN en el mismo amortiguador durante 50 minutos.

B1: Equilibrio de la columna con TFA al 0,1 %/H₂O y elución mediante un gradiente de 0 % CH₃CN/0,1 % de TFA/H₂O a 60 % de CH₃CN/0,1 % de TFA/H₂O durante 50 minutos. El análisis de RP-HPLC alternativo se realizó usando la detección UV a 214 nm y una columna de sílice C-18 Symmetry300, 3,6 mm x 150 mm, 3,5 μ (Waters) que se eluyó a 1 mL/min a 42° C.

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

[0183] Se usó la siguiente instrumentación:

LCMS se realizó en un espectrómetro de masa Sciex API 100 Simple, bomba Quard de Perkin Elmer Series 200, auto-ensamblador Perkin Elmer Series 200, detector de UV Applied Biosystems 785A, detector de dispersión de luz por evaporación Sedex 75.

[0184] El control del instrumento y los datos de adquisición de hicieron por los elementos de programación (software) de control Sciex Sample que corre en una computadora Windows 2000.

[0185] La bomba de HPLC se conecta a dos depósitos de eluyente que contienen:

A: ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua

B: ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo

[0186] El análisis se realiza a temperatura ambiente inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 20 μ l) en una columna que se eluye con un gradiente de acetonitrilo.

[0187] Las condiciones de HPLC, ajustes del detector y ajustes del espectrómetro de masas usados se dan en la

siguiente tabla.

Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm de diámetro interno, 5 µm
 Gradiente: 5 %-90 % de acetonitrilo lineal 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 de MS API-ES

5 **[0188]** De manera alternativa, la LCMS se realizó en un dispositivo que consiste de Bomba G1312A Bin de Hewlett Packard serie 1100, compartimiento de columna de Hewlett Packard serie 1100, detector de arreglo de diodo G1315A DAD de Hewlett Packard serie 1100, detector de dispersión de luz por evaporación MSD y Sedere 75 de Hewlett Packard serie 1100 controlado por los elementos de programación Chemstation de HP. La bomba de HPLC se conecta a dos depósitos de eluyente que contienen:

10 A: NH₄OH 10 mM en agua
 B: NH₄OH 10 mM en 90 % de acetonitrilo.

15 **[0189]** El análisis se realizó a 23° C inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 20 µl) en la columna que se eluye con un gradiente de A y B.

[0190] Las condiciones de HPLC, ajustes del detector y ajustes del espectrómetro de masas usadas se dan en la siguiente tabla.

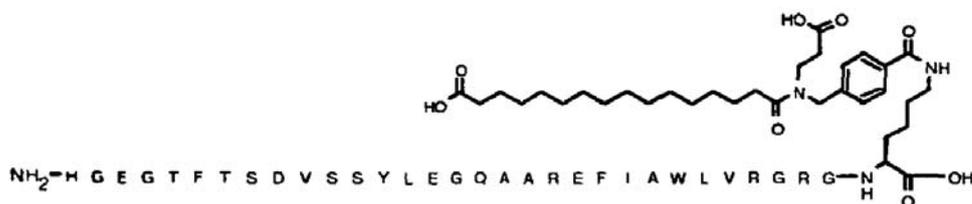
Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm de diámetro interno, 5 µm
 Gradiente: 5 %-90 % de acetonitrilo lineal durante 6,5 min a 1,5 mL/min
 Detección: 210 nm (salida análoga de DAD)
 ELS (salida análoga de ELS)
 Modo de ionización de MS API-ES. Exploración 100-1000 amu etapa 0,1 amu.

20 Radioligando que se une a las membranas de plasma que expresan el receptor GLP-1 de humano

25 **[0191]** La prueba de unión se realizó con membranas de plasma purificadas que contienen el receptor de GLP-1 de humano. Las membranas de plasma que contienen los receptores se purificaron de las células tk-ts 13 de BHK que se expresan establemente. Las membranas se diluyeron en el Amortiguador de prueba (HEPES 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,0005 %, pH = 7.4) hasta una concentración final de 0,2 mg/mL de proteína y se distribuyó a placas de microtitulación de 96 pozos pre-recubiertas con PEI al 0,3 %. Las membranas en presencia de ligandos no etiquetados de [¹²⁵I]GLP-1 0,05 nM en concentraciones en aumento y diferentes concentraciones de HSA (0,005 %, 0,05 % y 2 %) se incubaron 2 h a 30° C. Después de la incubación, los ligandos no unidos se separaron de los ligandos unidos por filtración a través de un múltiple al vacío seguido de lavado de 2X100 µL con el amortiguador de prueba enfriado con hielo. Los filtros se secaron durante la noche a RT, se perforaron y se cuantificaron en un contador γ.

Ejemplo 1

[0192]



35 Péptido Lys^{ε38}((4-([N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil)benzoil)[Gly8;Arg26,34;Lys38]GLP-1(7-37))

40 **[0193]** El péptido de [Gly8;Arg26,34;Lys38]GLP-1-(7-37) se preparó por síntesis peptídica en fase sólida Fmoc estándar y se purificó por HPLC preparativa. Se disolvió el ácido 4-([N-(2-ter-butoxicarboniletíl)-N-(15-terbutoxicarbonilpentadecanoil)amino]metil)benzoico (36 mg) en THF (1,0 mL) y se adicionaron DIPEA (7 µL) y TSTU (17 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h la mezcla se diluyó con THF (1 mL). De la suspensión resultante, se adicionaron 200 µL a una solución del péptido [Gly8;Arg26,34;Lys38]GLP-1(7-37) (15 mg) y DIPEA (15 µL) en agua (1,0 mL). Después de 0,5 h, se adicionó más agente de acilación (50 µl de la solución anterior). Después de 1,5

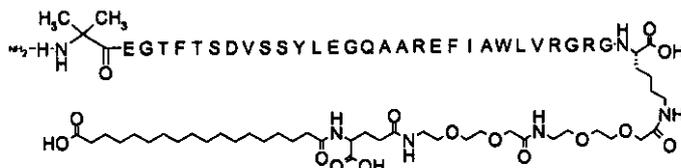
h la mezcla se concentró a presión reducida, y los ésteres de *ter*-butilo se solvolaron mediante el tratamiento con TFA al 95 % durante 15 minutos. El producto final se purificó por HPLC preparativa. Se obtuvieron 1,3 mg del compuesto del título.

HPLC (método B4): RT = 9,13 minutos (93 %).

5 LCMS: m/z = 1334 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1334.

Ejemplo 2

[0194]



10 Péptido [Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil]-OH.

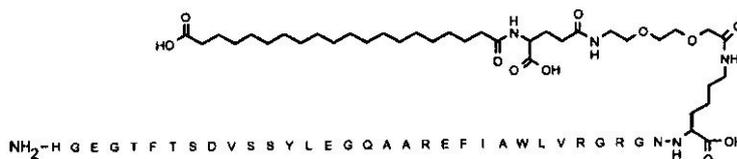
[0195] Se preparó el péptido [Aib8;Arg26,34]GLP-1-(7-37)Lisina por la síntesis peptídica en fase sólida Fmoc estándar y se purificó por HPLC preparativa. Se disolvió [Aib8;Arg26,34]GLP-1-(7-37)Lisina en agua (10 mL) y se adicionó DIPEA
 15 (37 ul). Se disolvió el ácido 4-[N-hexadecanoilsulfamoi]butírico de éster *ter*-butílico del ácido 17-((S)-1-*ter*-butoxicarbonil-3-[2-[2-((2-[2-2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi]etoxi]etilcarbamoil)metoxi)etoxi]etilcarbamoil)propilcarbamoil)hetadecanoico (16 mg) en acetonitrilo (1 mL) y se adicionó en pequeñas porciones. Después de agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos, la mezcla de reacción se liofilizó O/N. Al compuesto aislado se adicionaron 10 mL de TFA al 90 % / TIS al 5 % / agua al 5 % y la mezcla de reacción estuvo en reposo durante 30 minutos, se evaporó
 20 in vacuo y se co-evaporó con heptano. El aceite residual se disolvió en 15 mL de agua que contiene 1 % de NH₃ acuoso y se purificó por HPLC preparativa para dar el compuesto del título.

HPLC (método B4): RT = 9.25 minutos (100 %)

LCMS: m/z = 1423 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1423.

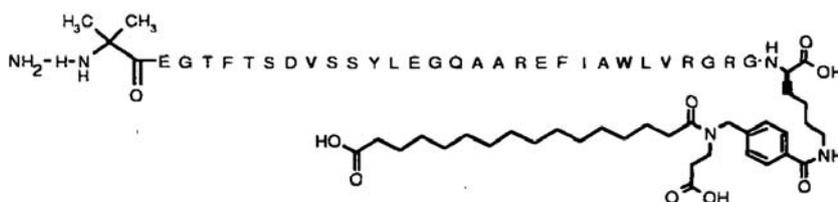
25 Ejemplo 3

[0196]



Ejemplo 4

30 [0197]



[0198] [Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)Lys(4-[[N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil]benzoil)-péptido

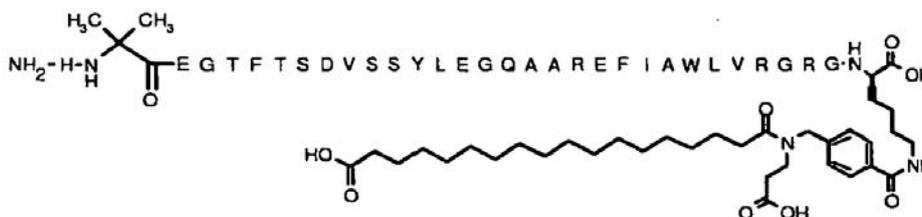
El péptido [Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)Lys comenzando a partir de 150 mg de la resina de cloruro de 2-clorotritilo (1.4 mmol/g) se preparó por síntesis peptídica en fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo de
 35 Lys se protegió como Lys(ivDde) mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se

protegieron con los grupos protectores lábiles de ácidos estándares. Luego, el ácido 4-((N-(2-ter-butoxicarboniletil)-N-(15-terbutoxicarbonilpentadecanoil)amino)metil)benzoico (126 mg) disuelto en NMP (1 mL) se acopló al péptido enlazado a la resina usando DIC/HOAt. El péptido finalmente se desprotegió y se dividió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). El péptido se aisló por LC-MS.

5 HPLC: Eluatos a 51,5 % de acetonitrilo.
MALDI-MS: 4025.

Ejemplo 5

10 [0198]



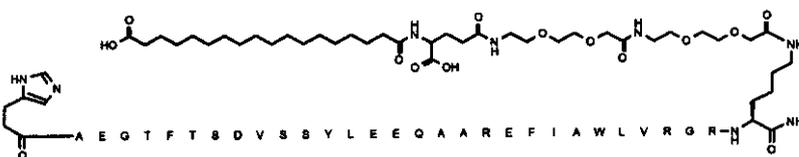
[0200] [Aib₈,Arg_{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(4-{{N-(2-carboxietil)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino}metil)benzoil)-péptido

El péptido [Aib₈,Arg_{26,34}]GLP-1(7-37)Lys comenzando a partir de 150 mg de la resina de cloruro de 2-clorotritilo (1.4 mmol/g) se preparó por síntesis peptídica en fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. El residuo de Lys se protegió como Lys(ivDde) mientras que las cadenas laterales funcionales para los otros aminoácidos se protegieron con los grupos protectores lábiles de ácidos estándares. Luego, el ácido 4-((N-(2-ter-butoxicarboniletil)-N-(17-terbutoxicarbonilheptadecanoil)amino)metil)benzoico (126 mg) disuelto en NMP (1 mL) se acopló al péptido enlazado a la resina usando DIC/HOAt. El péptido finalmente se desprotegió y se dividió de la resina con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). El péptido se aisló por LC-MS.

15 HPLC: Eluatos a 54,4 % de acetonitrilo.
20 MALDI-MS: 4057.

Ejemplo 6

[0201]



25 péptido N-ε³⁷-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(8)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][ImPr⁷,Glu²²,Arg^{26,34},Lys³⁷], GLP-1-(7-37).

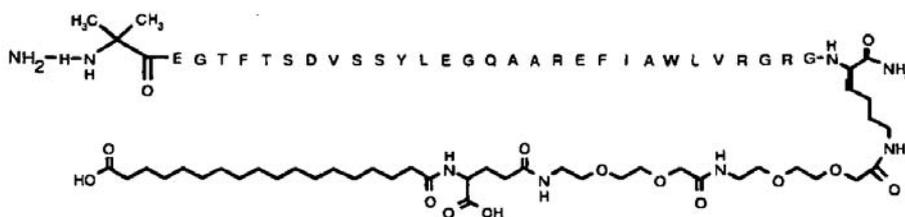
HPLC (método B6): RT = 32,4 minutos

HPLC (método A1): RT = 43,4 minutos

30 LCMS: m/z = 1419,3 (MH₃³⁺). Calculado para M⁺: 4254.8

Ejemplo 7

[0202]



35 [0203] [Aib₈,Arg_{26,34}]GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]

Estudio farmacodinámico usando ratones db/db

[0207] En un aspecto de esta invención los agonistas de GLP-1 tienen una duración de acción de por lo menos 24 horas después de la dosificación de 30 nmol/kg a ratones db/db.

[0208] La eficacia y la duración de la acción se miden en ratones db/db.

[0209] Los ratones db/db machos se transportan de Taconic, Dinamarca a la edad de 8-10 semanas. A partir del momento de su llegada, los ratones se alojan bajo condiciones estándares, pero a 24° C. Los ratones se mantienen 10 por caja hasta la experimentación con libre acceso a alimento estándar (Altromin, Brogaarden APS., Dinamarca) y agua de la llave en un día normal: ciclo de luz (luz a las 6 de la mañana). Los ratones se usan para 1 experimento por semana durante 3 semanas. Después de esto, los ratones se someten a eutanasia.

[0210] Después de un periodo de aclimatación de 1 semana, se mide la glucosa en la sangre tomando una muestra con capilar en la punta de la cola. En resumen, se muestrean 5 µl de sangre en tubos capilares de vidrio heparinados y se suspende inmediatamente en 250 µl de solución de amortiguador EBIO (Eppendorf, Alemania) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La concentración de glucosa en la sangre se mide por el método de glucosa oxidasa en el Analizador EBIO Plus Auto (Eppendorf, Alemania).

[0211] El corte del valor para la glucosa en sangre es de 10 mM. Cuando se evalúan los ratones, es esencial que todos los 42 ratones que entran al experimento tengan valores de glucosa en sangre por encima de 10 mM, pero también que la varianza de inter-ratones sea pequeña. Por lo tanto, si muchos de los ratones no están gravemente diabéticos, mientras que algunos lo están, el arranque de los experimentos debería posponerse una semana y hacerse nuevas mediciones de glucosa en sangre basales.

[0212] Con base a los valores de glucosa en sangre basales, los ratones se distribuyen a 7 grupos de n=6 igualando los valores del grupo de la glucosa en sangre media.

[0213] El día de la prueba se estiman los valores por la mañana de la glucosa en sangre basal como se describió anteriormente y se estima el peso corporal basal de cada ratón. En el tiempo 0, el compuesto se dosifica subcutáneamente en la nuca del cuello (volumen de dosificación aproximado 300 µL/50 g de ratón).

[0214] Los valores de glucosa en sangre se siguen hasta 48 horas (tiempo 1, 3, 6, 24 y 48 h) y se estima el peso corporal terminal.

[0215] Todos los datos se introducen en Graphpad Prism donde se calculan la media de la glucosa en sangre y la media de los pesos corporales delta.

[0216] Un aspecto de esta invención es preparar análogos/derivados de GLP-1 con vidas medias en plasma extendidas que sean apropiados para la administración una vez por semana. Las propiedades farmacocinéticas pueden evaluarse en minicerdos o cerdos domésticos como se describe a continuación.

Tamizado farmacocinético de análogos de GLP-1 una vez por semana

[0217] El tamizado farmacocinético de análogos de GLP-1 para la identificación de los candidatos una vez por semana apropiados se realizó sobre los candidatos que, de acuerdo con el plan de tamizados del proyecto, se mostraron que eran suficientemente potentes con respecto al potencial de disminución de glucosa en un modelo de ratón diabético (ratones db/db) y subsecuentemente, tuvo un tiempo de duración de 48 horas o más en el modelo de ratón db/db.

Tamizado primario

[0218] La primera parte del tamizado farmacocinético consistió de una administración subcutánea de dosis simple de 2 nmol/kg a tres mini-cerdos que pesan 8-12 kg. Las muestras de sangre se extrajeron de cada animal a una predosis, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-inyección. Todas las muestras de sangre se estabilizaron con un amortiguador de estabilización especial que consiste de: EDTA (di-sódico) 0,18 M, Aprotinina 15000 KIE/ml, Val-Pyr 0,30 mM, pH ajustado a 7.4 para prevenir la degradación enzimática de los análogos de GLP-1. El plasma se colectó de cada una de las muestras de sangre estabilizadas por centrifugación (4° C, 10 minutos, 1270 G (4000 rpm) y se analizó el contenido del análogo de GLP-1 por las pruebas de ELISA. Se usaron tres diferentes pruebas de ELISA para el análisis del plasma: "La "Prueba total" usando la combinación del anticuerpo F1/Ra2135 que detecta la molécula 7-37GLP-1 intacta N-terminalmente y la molécula 9-37GLP-1 degradada enzimáticamente N-terminal con un límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) de 35 pM y un intervalo analítico dinámico de 35-30000 pM. La "Prueba intacta"

usando la combinación del anticuerpo F1/Mac26.1. Esta prueba fue para detectar únicamente la molécula 7-37GLP-1 intacta N-terminalmente. El LOD fue 35 pM y un intervalo analítico dinámico de 35-30000 pM. La "prueba intacta Aib" usando la combinación del anticuerpo F1/GLP162-3F15. Esta prueba fue para detectar la Aib estabilizada N-terminal de la molécula de GLP-1 que permite la detección de los análogos de GLP-1 estabilizados. El LOD fue de 45 pM y el intervalo analítico dinámico de 45-30000 pM.

[0219] Todos los perfiles de concentración-tiempo del plasma se analizaron farmacocinéticamente por un análisis no compartimentario. Los siguientes parámetros farmacocinéticos se calcularon si los datos lo permiten: $t_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, AUC, AUC/Dosis, $AUC_{\%Extrapol}$, λ_z , $t_{1/2}$, CL/F, V_z/F y MRT.

Tamizado secundario

[0220] Una segunda parte del tamizado farmacocinético se llevó a cabo en los compuestos con una vida media terminal inicial de 60-70 horas o más. Este tamizado consistió de una administración intravenosa y subcutánea de una dosis de 2 nmol/kg a seis mini-cerdos para cada ruta de administración. El esquema de muestreo de la sangre se extendió de 0-120 horas a 0-432 y 0-504 horas después de la administración intravenosa y subcutánea respectivamente. Esto se realizó para aumentar la precisión y la exactitud de los parámetros farmacocinéticos estimados, especialmente la vida media terminal, AUC y los parámetros derivados clarificación y volumen de distribución y para estimar la biodisponibilidad posterior a la administración subcutánea.

PRUEBA DE GLP-1 (AIB8-INTACTA)

[0221] La prueba fue una prueba de dos sitios con incubación simultánea del analito con un anticuerpo receptor y detector. Se empleó un sustrato quimioluminiscente listo para usarse para maximizar la señal. La prueba no reconoce GLP-1 (7-37) endógeno ni la DPPIV que divide GLP-1 (9-37).

Plasma de referencia para las pruebas de GLP-1

[0222] El plasma 0 se preparó del plasma de EDTA de fondo sin Pirroliduro de Valina y Aprotina de los animales en ayuno. El plasma de EDTA de fondo se incubó a 37° C durante 4 horas para remover las trazas de GLP-1 y se adicionaron después de la incubación de Pirroliduro de Valina y Aprotinina.

Amortiguadores

Amortiguador de recubrimiento

[0223] Se usó PBS como el amortiguador de recubrimiento: Fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 145 mM ajustado a pH 7.4.

Amortiguador de lavado

[0224] PBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v)

Amortiguador de prueba

[0225] PBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v), 10 g/L de BSA y 10 mg/L de anti-TNP.

Amortiguador de estreptavidina

[0226] Amortiguador de lavado con un adicional de NaCl 0,5M.

Sustrato

[0227] Sustrato SuperSignal ELISA Femto listo para usarse (Pierce, cat. no. 37075).

Estándares

[0228] Los estándares se prepararon de una solución patrón 25 μ M de 0113-0000-0217. El péptido se diluyó en forma serial en el plasma de referencia para hacer los estándares con concentraciones finales de 30000-10000-3333-1111-370-123-41 y 0 pM. Los estándares se almacenaron en tubos Micronic en alícuotas de 100 μ L a -20° C.

Procedimiento de prueba

[0229] Se recubrieron Microplacas Crystal 2000 (negras) con el anticuerpo monoclonal GLPb1-7F1, 100 µL de 5 µg/mL en PBS durante la noche a 4° C.

5

[0230] Las placas se lavaron 5 veces con el amortiguador de lavado en un lavador de placas automatizado (SkanWasher, Skatron) y se dejaron en reposo durante por lo menos 30 minutos con el amortiguador de lavado para bloquear los sitios restantes.

10

[0231] 20 µL de la muestra o el estándar se adicionó a cada pozo por duplicado, seguido inmediatamente por 100 µL de GLP162-3F15 biotinilado, 1 µg/mL en el amortiguador de prueba. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placa seguido de 5 ciclos de lavado como se describió anteriormente. 100 µL de solución de estreptavidina-peroxidasa (KPL, código 14-30-00, 1:20000 en amortiguador de estreptavidina) se adicionó a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placa. Las placas se lavaron como se describió anteriormente y después se adicionaron libremente 100 µL de SuperSignal femto. Las placas se colocaron en un agitador durante 1 minuto y se midieron en un Luminómetro Orion (Berthold). Los datos se transfirieron a MultiCalc y las curvas estándares se calcularon usando el método 4PL ponderado. Las concentraciones de las muestras se calcularon de la curva estándar.

15

20 **PRUEBA DE GLP-1 (TOTAL)**

[0232] La prueba fue una prueba de dos sitios con incubación simultánea del analito con un anticuerpo receptor y detector. La prueba reconoce GLP-1 dividido N-terminalmente hasta GLP-1(12-37).

25

Amortiguadores

[0233] Amortiguador de recubrimiento

[0234] Se usó PBS como el amortiguador de recubrimiento: Fosfato de sodio 10 mM y cloruro de sodio 145 mM ajustado a pH 7.4.

30

Amortiguador de lavado

[0235] PBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v)

35

Amortiguador de prueba

[0236] PBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v), 10 g/L de BSA y 10 mg/L de anti-TNP.

40

Amortiguador de estreptavidina

[0237] Amortiguador de lavado con un adicional de NaCl 0,5M.

Sustrato

45

[0238] Sustrato TMB listo para usarse (KemEnTec, código 4380A).

Amortiguador de paro

50

[0239] H₃PO₄ 4M

Estándares

[0240] Los estándares se prepararon de una solución patrón 25 µM de 0113-0000-0217. El péptido se diluyó en forma serial en el plasma de referencia para hacer los estándares con concentraciones finales de 30000-10000-3333-1111-370-123-41 y 0 pM. Los estándares se almacenaron en tubos Micronic en alícuotas de 100 µL a -20° C.

55

Procedimiento de prueba

[0241] Las placas de microtitulación Maxisorp (NUNC) se recubrieron con el anticuerpo monoclonal GLPb1-7F1, 100 µL de 5 µg/mL en PBS durante la noche a 4° C.

60

[0242] Las placas se lavaron 5 veces con el amortiguador de lavado en un lavador de placa automatizado (SkanWasher, Skraton) y se dejaron en reposo durante por lo menos 30 minutos, con el amortiguador de lavado para bloquear los sitios restantes.

5 [0243] Se adicionaron 20 μL de la muestra o estándar a cada pozo seguido inmediatamente por 100 μL de Ra2135-biotinilado, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el amortiguador de prueba. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placa seguido de 5 ciclos de lavado como se describió anteriormente.

10 [0244] 100 μL de solución de estreptavidina-peroxidasa (Amersham Biosciences código RPN4401V, 1:8000 en amortiguador de prueba) se adicionó a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placa. Las placas se lavaron como se describió anteriormente y después se adicionaron libremente 100 μL de TMB y después de 5 minutos se interrumpieron con 100 μL de H_3PO_4 .

15 [0245] Las placas se midieron en un lector Victor Multilabel (Wallac). Los datos se transfirieron a MultiCalc y las curvas estándares se calcularon usando el método 4PL ponderado. Las concentraciones de las muestras se calcularon de la curva estándar.

20 [0246] Los procedimientos experimentales en vida, el análisis del plasma y el análisis farmacocinético fueron idénticos a los descritos en el tamizado primario.

donde n es 1 y s es 1.

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde Xaa₇ es His o desamino-histidina:

- 5 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys o Aib;
 Xaa₁₆ es Val;
 Xaa₁₈ es Ser;
 Xaa₁₉ es Tyr;
 Xaa₂₀ es Leu;
 10 Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;
 Xaa₂₃ es Gln o Glu;
 Xaa₂₅ es Ala;
 Xaa₂₆ es Lys o Arg;
 Xaa₂₇ es Glu;
 15 Xaa₃₀ es Ala o Glu;
 Xaa₃₃ es Val;
 Xaa₃₄ es Lys o Arg;
 Xaa₃₅ es Gly o Aib;
 Xaa₃₆ es Arg, Lys o está ausente;
 20 Xaa₃₇ es Gly, Asn o está ausente;
 Z es OH o NH₂.

3. Compuesto según la reivindicación 2 donde

- 25 Xaa₇ es His;
 Xaa₈ es Aib;
 Xaa₁₆ es Val;
 Xaa₁₈ es Ser;
 Xaa₁₉ es Tyr;
 30 Xaa₂₀ es Leu;
 Xaa₂₂ es Gly o Glu;
 Xaa₂₃ es Gln;
 Xaa₂₅ es Ala;
 Xaa₂₆ es Arg;
 35 Xaa₂₇ es Glu;
 Xaa₃₀ es Ala;
 Xaa₃₃ es Val;
 Xaa₃₄ es Arg;
 Xaa₃₅ es Gly;
 40 Xaa₃₆ es Arg;
 Xaa₃₇ es Gly o Asn;
 Z es OH o NH₂.

45 4. Análogo de GLP-1 de conformidad con las reivindicaciones 1-3, donde dicho análogo de GLP-1 comprende una modificación de la posición 22 a un Glu;

5. Análogo de GLP-1 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho análogo de GLP-1 comprende una modificación de la L-histidina N-terminal en la posición 7 de la secuencia GLP-1(7-37).

50 6. Análogo de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho análogo de GLP-1 comprende imidazopropionilo⁷, α-hidroxi-histidina⁷ o N-metil-histidina⁷, D-histidina⁷, desamino-histidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β-hidroxi-histidina⁷, homohistidina⁷, N^α-acetil-histidina⁷, α-fluorometil-histidina⁷, α-metil-histidina⁷, 3-piridilalanina⁷, 2-piridilalanina⁷ o 4-piridilalanina⁷.

55 7. Análogo de GLP-1 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho análogo de GLP-1 comprende una sustitución de la L-alanina en posición 8 de la secuencia de GLP-1(7-37) por otro residuo de aminoácido.

60 8. Análogo de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 7, donde dicho análogo de GLP-1 comprende Aib⁸, Gly⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, 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.

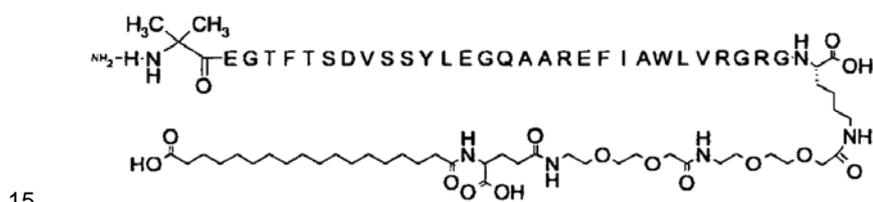
9. Análogo de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 8, donde dicho análogo de GLP-1 comprende Aib⁸.

5 10. Análogo de GLP-1 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho análogo de GLP-1 comprende no más de 3 residuos de aminoácidos que no se codifican por el código genético.

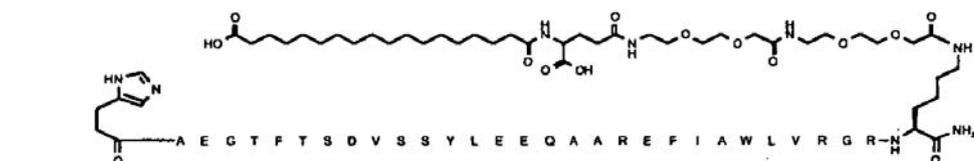
11. Análogo de GLP-1 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho análogo de GLP-1 comprende únicamente un residuo de lisina.

10 12. Análogo de GLP-1 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha lisina está en la posición 38 con relación a la secuencia GLP-1(7-37).

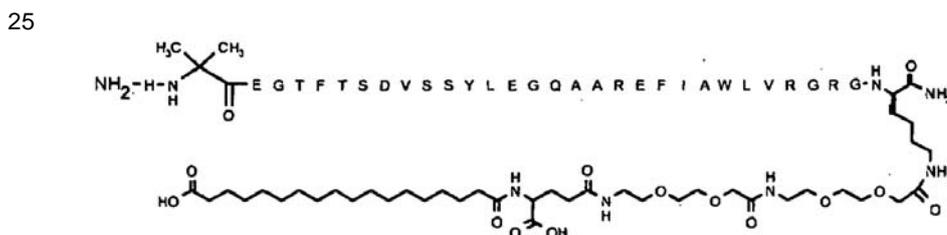
13. Compuesto de conformidad con la reivindicación 1, que se selecciona de



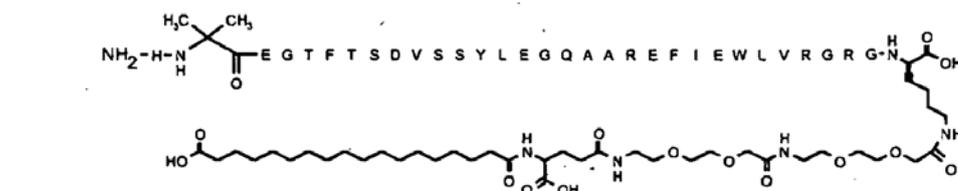
[Aib8,Arg26,34] GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetil]-OH,



péptido N-ε³⁷-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetil][ImPr⁷,Glu²²,Arg^{26,34},Lys³⁷], GLP-1-(7-37),



[Aib8,Arg26,34]GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetil]-amida,



y péptido [Aib8,Arg26,34Glu30] GLP-1(7-37)Lys[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino] etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetil].

14. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 15. Uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para la preparación de un medicamento.
16. Compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para usar como un medicamento.
- 10 17. Compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia a la glucosa dañada, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad cardíaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares, ataque, síndrome de intestino inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 15 18. Compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 20 19. Compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β y/o para restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β .
- 25 20. Uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia a la glucosa dañada, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad cardíaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares, ataque, síndrome de intestino inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
21. Uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para preparar un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 30 22. Uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β y/o para restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β .