

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 752**

51 Int. Cl.:
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04752496 .2**
96 Fecha de presentación: **17.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1633384**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Análogos estables de GLP-1**

30 Prioridad:
15.05.2003 US 471411 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE
BALLOU HALL
MEDFORD, MA 02155, US**

72 Inventor/es:
**BACHOVCHIN, William W.;
LAI, Hung-Sen y
SANFORD, David George**

74 Agente/Representante:
Rizzo, Sergio

ES 2 383 752 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).

Análogos estables de GLP-1**Antecedentes de la invención**

[0001] Los productos terapéuticos de polipéptidos y péptidos son comúnmente utilizados en la práctica médica. Su facilidad de producción, mediante tecnología del ADN recombinante o sintetizadores de péptidos, asegura su uso continuado en una variedad de circunstancias en los próximos años. Por consiguiente, los productos terapéuticos con polipéptidos, como hormonas, citoquinas y factores de crecimiento, representan una clase importante de agentes terapéuticos. Sin embargo, determinados polipéptidos nativos pueden ser rápidamente inactivados *in vivo* por medio de proteólisis o isomerización. Dicha inactivación puede resultar inconveniente en los casos en los que se desea mantener un nivel de sangre constante o mantenido del producto terapéutico durante un periodo de tiempo, puesto que será necesaria entonces una administración repetida. En algunos casos, uno o más productos proteolíticos del polipéptido pueden ser antagonistas a la actividad del polipéptido intacto. En estos casos, la administración de solo un producto terapéutico adicional puede ser insuficiente para superar el efecto antagonista de los productos proteolíticos.

[0002] Para una mayor ilustración, una clase de hormonas peptídicas cuya presencia prolongada en la sangre puede ser beneficiosa incluye los péptidos similares al glucagón tipo 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2, respectivamente), péptido insulíntrópico dependiente de la glucosa (GIP), neuropéptido Y (NPY), polipéptido pancreático (PP), y péptido YY (PYY). El GLP-1 es una importante hormona polipeptídica con función reguladora en el metabolismo de la glucosa y el metabolismo y secreción gastrointestinal. Los esfuerzos actuales muestran que el GLP-1 es un factor de crecimiento para las células beta en el páncreas y quizá esté implicado también en la diferenciación celular en otros órganos. El GLP-2 es un péptido de 33 aminoácidos que tiene una aplicación terapéutica en el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal. En particular, se ha determinado que el GLP-2 actúa como agente trófico para mejorar y mantener una correcta función gastrointestinal, así como para promover el crecimiento de los tejidos intestinales (Véase, p.ej., las patentes estadounidenses nº 5.834.428; 5.789.379; y 5.990.077; y la Publicación Internacional nº WO 98/52600). El GIP es un péptido de 42 aminoácidos sintetizado y segregado por las células endocrinas en el intestino delgado (Véase R. A. Pederson, et al., *Endocrinology* 99, 780- 785 (1976) y T. B. Usdin, et al., *Endocrinology* 133, 2861-2870 (1993)). Las infusiones de GIP han demostrado que inhiben los efectos del glucagón en el hígado, mientras que resaltan los de la insulina. Además, el GIP tiene un efecto doble en el flujo de sangre hepática, aumentando el flujo a través de la vena porta e

inhibe el flujo por la arteria hepática. El neuropéptido Y es un miembro de 36 aminoácidos de la familia del polipéptido pancreático. Se encuentra altamente concentrado en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos, es la sustancia conocida más potente que causa un aumento en la alimentación, y puede tener un papel en la base genética de la diabetes mellitus tipo II (Véase las patentes estadounidenses nº 6410701, 6075009, 5026685, 5328899, y K. Tatemoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5485-5489 (1982)). El péptido YY (PYY) y el polipéptido pancreático (PP) son hormonas peptídicas relacionadas estructuralmente implicadas en la pérdida de memoria, depresión, ansiedad, epilepsia, dolor, hipertensión, y trastornos alimentarios y del sueño.

[0003] Se cree que estas hormonas polipeptídicas, y otros factores polipeptídicos, son degradados por los miembros de la clase escisora de la post-prolina de las enzimas serina proteinasa, como la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). La DPP IV es una membrana asociada a la serina peptidasa que escinde dipéptidos N-terminales de una cadena peptídica que contiene en la penúltima posición (P1), preferentemente, un residuo de prolina, o un residuo de alanina si el residuo N-terminal (P2) es histidina o un gran aromático como tirosina, triptófano o fenilalanina. La secuencia amino terminal del GLP-1, el GIP, y el GLP-2 es His-Ala-Glu, Tyr-Ala-Glu, y His-Ala-Asp respectivamente. La secuencia amino terminal del NPY, el PP y el PYY es Tyr-Pro-Ser, Ala-Pro-Leu y Tyr-Pro-Ile respectivamente. Por lo tanto, la DPP IV ha sido implicada en la regulación de la actividad de cada una de estas hormonas polipeptídicas, así como otros polipéptidos, *in vivo*.

[0004] La eliminación mediada por DPP IV de los dipéptidos Xaa-Ala o Xaa-Pro, en el que Xaa es un residuo de aminoácido, de la N-terminal de las hormonas peptídicas bioactivas arriba mencionadas los vuelve inactivos, o incluso antagónicos. Por tanto, la escisión e inactivación de las hormonas peptídicas mediante serina proteinasas como la DPP IV es sólo un ejemplo que ilustra la significativa limitación impuesta por la proteólisis al uso de polipéptidos terapéuticos. El descubrimiento de análogos que muestran estabilidad ante la proteólisis, como la inactivación mediada por DPP IV, tiene por lo tanto un especial interés. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de hormonas peptídicas resistentes a la proteólisis.

Resumen de la invención

[0005] La presente invención proporciona generalmente composiciones de análogos de péptidos y polipéptidos (aquí "análogos de GLP-1") que son resistentes a la escisión por proteinasas (p.ej., análogos que son resistentes a la proteólisis).

[0006] Los inventores han observado que la modificación de sustratos de la proteinasa que escinde la post-prolina en la posición P'₁ (el residuo del lado carboxilo

terminal del lugar de la escisión de amida) puede producir análogos del sustrato con una susceptibilidad muy reducida a la escisión mediada por enzimas en comparación con el sustrato nativo, al tiempo que se mantiene la actividad biológica del sustrato nativo. Por ejemplo, la modificación de sustratos de la serina proteinasa DPP IV
5 escisora de post-prolina con un análogo de aminoácido en el residuo P₁' (del lugar de escisión de DPP IV) resulta en un sustrato análogo con una susceptibilidad reducida a la escisión mediante DPP IV, pero manteniendo la actividad biológica del sustrato subyacente.

[0007] La invención hace referencia a la observación más general de que la
10 modificación de los sustratos de proteinasa en el residuo P₁' (del lugar de escisión) con un análogo de aminoácido que tenga un C β carbono tetrasustituido puede aumentar notablemente la vida media *in vivo* del análogo resultante, p.ej., que puede tener una mayor duración de la acción biológica y/o una eliminación reducida en comparación con el polipéptido de tipo natural. Basándose en este descubrimiento, y su
15 aplicabilidad a sustratos escindidos por una gama diversa de proteinasas, la presente invención proporciona un método para producir análogos P₁' de sustratos para proteinasas tales como serina proteinasas, metaloproteinasas, proteinasas aspárticas, y cisteína proteinasas.

[0008] La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que
20 comprenden uno o más de los "análogos de GLP-1" en cuestión. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas comprenden uno o más análogos de "GLP-1" formulados con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0009] Los análogos de GLP-1 en cuestión pueden administrarse solos, o pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que incluya otras terapias
25 apropiadas para la indicación de la enfermedad específica. A modo de ejemplo, la administración de un análogo de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes puede usarse sola, o puede usarse en combinación con la modulación de la dieta y ejercicio, y/o con la administración de insulina. Otros ejemplos de métodos combinatorios de tratamiento comprenden la administración de análogo de GLP-1 y administración de
30 un inhibidor de la enzima específica que escinde el polipéptido nativo. Dicho inhibidor puede ser específico para la enzima concreta (p.ej., un inhibidor específico de DPP IV) o puede ser más genérico a la clase de enzimas (p.ej., un inhibidor de serina proteasas).

[0010] Otra área de la presente invención es el uso de los análogos de GLP-1 para
35 fines de diagnóstico.

[0011] Otro aspecto de la presente invención es el uso de análogos de GLP-1 para la fabricación de un medicamento que proporciona péptidos resistentes a la proteinasa.

[0012] Otro aspecto de la presente invención es el uso de un análogo de GLP-1 en la fabricación de un medicamento terapéutico.

Breve descripción de los dibujos

[0013]

- 5 La Figura 1 muestra un esquema de la degradación de un GLP-1 nativo por DPP IV.
- La Figura 2 resume los resultados de HPLC/MS demostrando que dos análogos de péptido diferentes de GLP-1 (7-37) son resistentes a la escisión por DPP IV.
- 10 La Figura 3 muestra que el análogo de GLP-1 sustituido con 3-dimetil-aspartato mantiene las actividades funcionales del GLP-1 nativo. El gráfico de la izquierda muestra que el GLP-1 y el GLP-1 (3-DMA) se enlazan al receptor con afinidades similares, aunque no idénticas. El gráfico de la derecha muestra que el GLP-1 y el GLP-1 (3-DMA) tienen una capacidad de señalización
- 15 sustancialmente idéntica medida por la producción de AMPc tras la exposición a GLP-1 o análogo de GLP-1.
- La Figura 4 muestra que el análogo de GLP-1 (GLP-1 (BM)) sustituido por 3-butil-metil-glicina mantiene la actividad funcional del GLP-1 nativo. El gráfico muestra que el GLP-1 y el GLP-1 (BM) tienen una capacidad de señalización
- 20 sustancialmente idéntica medida por la producción de AMPc tras la exposición a GLP-1 o análogo de GLP-1.
- La Figura 5 muestra que el GLP-1(7-37) amida tratado con DPP IV humano durante dos horas (abajo) comparado con el péptido no tratado (arriba) por HPLC/MS. Téngase en cuenta que el tratamiento de GLP-1 (7-37) con DPP IV
- 25 dio como resultado una pérdida de péptido dependiente del tiempo.
- La Figura 6 muestra los resultados de tratar un análogo de GLP-1 que contiene un residuo de leucina terciaria (TLE) en lugar de ácido glutámico P¹ con DPP IV humano durante dos horas (abajo) comparado con un péptido no tratado (arriba) por HPLC/MS. Téngase en cuenta que el análogo de TLE-GLP
- 30 1 fue resistente a la degradación por DPP IV.
- La Figura 7 muestra una sustitución de una leucina terciaria (TLE) en la posición P¹ de un sustrato peptídico modelo por la serina proteasa trombina tiene como resultado la producción de un análogo peptídico resistente a escisión por trombina.
- 35 La Figura 8 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos por Exendin-4 durante con el paso del tiempo para tres dosis

diferentes (40 µg, 4 µg y 0,4 µg) en comparación con una solución de control salina.

La Figura 9 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis de 40 µg con el paso del tiempo comparado con el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para un control de solución salina o un control de GLP-1.

La Figura 10 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) para tres dosis diferentes (800 µg, 80 µg, y 8 µg) con el paso del tiempo comparado con un control de solución salina.

La Figura 11 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis de 20mg/kg con el paso del tiempo comparado con el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para un control de solución salina o un control de GLP-1.

La Figura 12 muestra el nivel de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis de 20mg/kg con el paso del tiempo comparado con el nivel de glucosa en sangre para un control de solución salina o un control de GLP-1.

La Figura 13 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para Exendin-4 con el paso del tiempo para tres dosis diferentes (8 µg, 0,8 µg y 0,08 µg) comparado con el control de solución salina.

La Figura 14 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para GLP-1 con el paso del tiempo para una dosis de 800 µg comparado con un control de solución salina.

La Figura 15 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para un análogo de GLP-1 (P1732) para dos dosis diferentes (8 µg y 0,8 µg) comparado con un control de solución salina.

La Figura 16 muestra ejemplos de modos de realización de la Fórmula (II), en los que los aminoácidos de origen natural han sido modificados en la posición-β (posición-3) con R₁ y R₂.

Descripción detallada de la invención

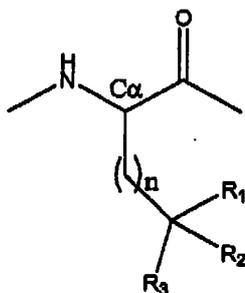
I. Resumen

[0014] La presente invención hace referencia generalmente a análogos de GLP-1 que presentan una vida media *in vivo* aumentada, p.ej., como resultado de la reducida

susceptibilidad a la escisión por enzimas proteolíticas, pero mantienen la actividad deseada del sustrato original.

[0015] La invención hace referencia al descubrimiento de que la modificación de sustratos de las proteinasas escisoras de post-prolina en la posición P'₁ (el residuo del lado carboxilo terminal del lugar de escisión de amida) puede producir sustratos análogos con una susceptibilidad muy reducida a la escisión mediada por enzimas en comparación con el sustrato nativo, al tiempo que mantienen la actividad biológica del sustrato nativo. Por ejemplo, la modificación de sustratos de serina proteinasa escisora de post-prolina DPP IV con un análogo aminoácido en el residuo P'₁ (del lugar de escisión de la DPP IV) da como resultado un sustrato análogo con una susceptibilidad reducida a la escisión mediante DPP IV, al tiempo que retiene la actividad biológica del sustrato subyacente.

[0016] Aunque se contempla la sustitución del residuo P'₁ con un aminoácido de origen natural, en los modos de realización preferidos, se sustituye el residuo de P'₁ con un análogo de aminoácido de origen no natural, y de forma aún más preferente, con uno que sea un análogo estructural, p.ej., que mantenga atributos similares con respecto a la naturaleza estérica y/o electrónica. En un primer aspecto, la invención proporciona un análogo de GLP-1 modificado que se presenta menos propenso a la proteólisis mediante las proteinasas escisoras de post-prolina, como la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), en el que el polipéptido se ha modificado en la posición P'₁ con un aminoácido o un análogo de aminoácido de la Fórmula I:



en el que,

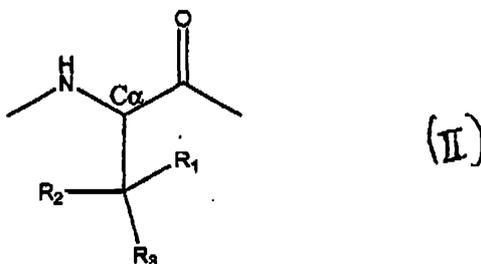
R₁ y R₂ se definen según la reivindicación 1 en la que n es \emptyset

[0017] En determinados modos de realización preferidos, R₁ y R₂ representan cada uno independientemente un metilo, etilo o propilo e incluso más preferentemente un metilo, un halógeno o un alquilo inferior halogenado.

[0018] En determinados modos de realización preferidos, R₃ representa un alquilo C₁-C₁₀, más preferentemente metilo, etilo o propilo, y aún más preferentemente un metilo. En otros modos de realización preferidos, R₃ representa un arilo, como el fenilo o hidroxifenilo (preferiblemente para-hidroxi). En otro modo de realización aún más

preferido, R_3 representa un grupo hidroxilo. En otro modo de realización aún más preferido, R_3 representa $-(CH_2)_mCOOH$, y preferiblemente en el que m es preferiblemente 0 ó 1.

5 **[0019]** Según la invención, los análogos de GLP-1 incluyen la modificación de P'_1 con un carbono $C\beta$ tetrasustituido, como se representa en la Fórmula II:



en el que R_1 , R_2 y R_3 siguen la definición de la reivindicación 1.

10 **[0020]** La invención hace referencia a la observación general de que la modificación de los sustratos de proteinasa en el residuo P'_1 (del sitio de la escisión) con un análogo aminoácido con un carbono $C\beta$ tetrasustituido aumenta notablemente la vida media *in vivo* del análogo resultante, p.ej., que puede presentar una mayor duración de la acción biológica y/o una escisión reducida en comparación con el polipéptido natural. Basándose en este descubrimiento, y su aplicabilidad en los sustratos escindidos por una amplia gama de proteinasas, la presente invención proporciona un

15 método para producir análogos de sustratos de P'_1 para tales proteinasas, como serina proteinasas, metaloproteinasa, proteinasas aspárticas, y cisteína proteinasas.

II. Definiciones

20 **[0021]** El término "sustrato" se refiere a un sustrato de una enzima sobre el que se actúa catalíticamente y es convertido químicamente por la enzima en producto(s).

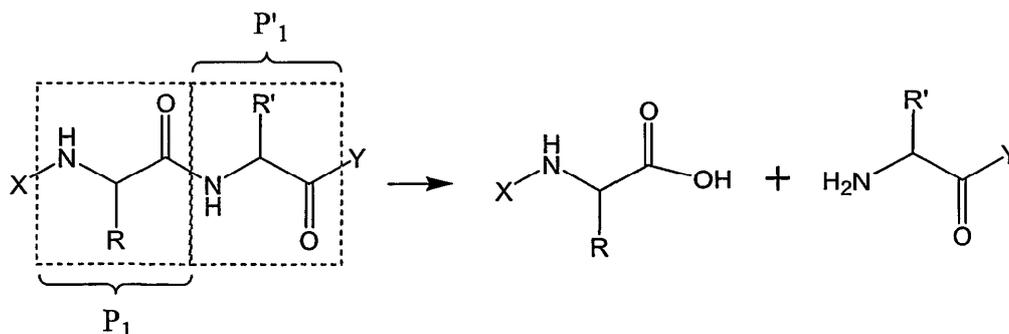
[0022] El sitio de unión de un sustrato peptídico consta de una serie de "subsitos de especificidad" en la superficie de la enzima. El término "subsito de especificidad" se refiere a un bolsillo u otro sitio de la enzima capaz de interactuar con una parte de un sustrato para la enzima.

25 **[0023]** Al analizar la interacción de los péptidos y sustratos de proteínas con proteinasas, p.ej., serina y cisteína proteinasas y similares, la presente solicitud utiliza la nomenclatura de Schechter y Berger [(1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162]. Los residuos de aminoácidos individuales de un sustrato o inhibidor se designan mediante $-P_2-P_1-P'_1-P'_2$, etc., y los subsitos de la enzima correspondientes

30 se designan mediante S_2, S_1, S'_1, S'_2 , etc. La unión escindible del sustrato es un enlace amida que une los residuos P_1 y P'_1 .

[0024] Un “residuo P₁” se refiere al residuo de aminoácido de un sustrato polipeptídico que se convierte en el nuevo amino terminal del polipéptido producto que resulta de la escisión mediada por proteinasas de la cadena principal amida del sustrato polipeptídico. Para mayor ilustración, un sustrato polipeptídico incluye una

5 caden principal amida que es sometida a una reacción proteolítica representada por el siguiente esquema general:



[0025] El término “residuo de aminoácido” se refiere a un aminoácido. En general, las abreviaturas utilizadas aquí para designar los aminoácidos de origen natural se basan en las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB

10 (véase Biochemistry (1972) 11:1726-1732). Por ejemplo, Met, Ile, Leu, Ala y Gly representan “residuos” de metionina, isoleucina, leucina, alanina y glicina, respectivamente. Con el residuo se hace referencia al radical obtenido del correspondiente α-aminoácido mediante la eliminación de la parte OH del grupo

15 carboxilo y la parte H del grupo α-amino.

[0026] El término “cadena lateral de aminoácidos” es aquella parte de un residuo de aminoácido sin incluir la cadena principal, como se define por K. D. Kopple, “Peptides and Amino Acids”, W. A. Benjamin Inc., New York and Amsterdam, 1966, páginas 2 y

20 33; son ejemplos de tales cadenas laterales de aminoácidos comunes –CH₂CH₂SCH₃ (la cadena lateral de metionina), –CH₂(CH₃)-CH₂CH₃ (la cadena lateral de isoleucina), –CH₂CH(CH₃)₂ (la cadena lateral de leucina) o H- (la cadena lateral de glicina). Estas cadenas laterales cuelgan de la cadena principal de carbono C_α.

[0027] El término “carbono C_β tetrasustituido” se refiere a un átomo de carbono que

25 (i) está suspendido directamente del carbono C_α de la cadena principal de aminoácido, y (ii) incluye cuatro sustituyentes colgados (incluyendo el carbono C_α), ninguno de los cuales es hidrógeno.

[0028] Según el uso aquí realizado, una “proteína” es un polímero que consta básicamente de cualquiera de los 20 aminoácidos. Aunque “polipéptido” se usa a menudo en referencia a proteínas relativamente grandes, y “péptido” se suele utilizar

30 en referencia a proteínas pequeñas, el uso de los términos en la técnica coincide y es

variado. A menos que resulte evidente por el contexto, los términos “péptido(s)”, “proteína(s)” y “polipéptido(s)” se utilizan aquí de manera intercambiable.

5 **[0029]** Según el uso aquí realizado, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos como el ácido desoxirribonucleico (ADN), y, si procede, ácido ribonucleico (ARN). Debe entenderse que el término también incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados a partir de análogos de nucleótidos, y, como aplicable al modo de realización que se está describiendo, polinucleótidos de cadena sencilla (sentido o antisentido) y de cadena doble.

10 **[0030]** La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (1984) ha recomendado el uso del término “peptidasa” para el subconjunto de hidrolasas de enlace peptídico (subclase E.C 3.4.). El término “proteasa” ampliamente utilizado es sinónimo de “peptidasa”, y se utilizan aquí de manera intercambiable. Las peptidasas comprenden dos grupos de enzimas: las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos en puntos dentro de la proteína, y las exopeptidasas eliminan los aminoácidos de manera secuencial de cualquiera de los extremos N-terminal o C-terminal.

15 **[0031]** El término “proteínasa” también se utiliza como sinónimo de endopeptidasa. Las proteínasas se clasifican según sus mecanismos catalíticos. La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha reconocido cuatro clases mecánicas: serina proteínasas, cisteína proteínasas, proteínasas aspárticas, y metaloproteínasas.

20 **[0032]** La clase “serina proteínasas” comprende dos familias distintivas: la familia de la quimotripsina que incluye las enzimas de los mamíferos como la quimotripsina, tripsina, elastasa o calicreína, y la familia de la subtilisina que incluye las enzimas bacterianas como la subtilisina. La estructura tridimensional general es diferente en las dos familias pero tienen la misma geometría de sitios activos y se produce la catálisis por medio de los mismos mecanismos. Las serina proteínasas presentan diferentes especificidades de sustrato que tienen relación con la sustitución de aminoácidos en varios subsitios de la enzima (véase la nomenclatura de Schechter y Berger) que interactúan con los residuos de sustrato. En el proceso catalítico son esenciales tres residuos que forman la tríada catalítica: His-57, Asp-102 y Ser-195 (número quimotripsinógeno).

25 **[0033]** La mayoría de las “cisteína proteínasas” incluyen las peptidasas de plantas como la papaína, actinidina o bromelaína, varias catepsinas lisosomales de mamíferos, las calpaínas citosólicas (activadas con calcio), y diversas peptidasas parásitarias (p.ej., Trypanosoma, Schistosoma). La papaína es el arquetipo y el miembro mejor estudiado de la familia.

[0034] La mayoría de las “proteinasas aspárticas” pertenecen a la familia de la pepsina. La familia de la pepsina incluye enzimas digestivas como la pepsina y la quimosina así como las catepsinas lisosomales D, que procesan enzimas como la renina, y determinadas peptidasas fúngicas (penicilopepsina, rhizopus pepsina, endothiapepsina). Una segunda familia comprende las proteinasas virales como la peptidasa del virus del SIDA (VIH) también llamada retropepsina.

[0035] Las “metaloproteinasas” se encuentran en las bacterias, hongos así como en organismos superiores. Difieren en gran medida en sus secuencias y estructuras pero la amplia mayoría de enzimas contiene un átomo de zinc que es activo catalíticamente. Muchas enzimas contienen la secuencia HEXXH, que proporciona dos ligandos de histidina para el zinc mientras que un tercer ligando es bien un ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanil-aminopeptidasa) o una histidina (astacina).

[0036] El término “agonista” según el uso aquí realizado, se refiere a un péptido o análogo P₁ que retiene la bioactividad del sustrato nativo de interés de manera que produce un efecto biológico similar cuando se administra a un animal.

[0037] El término “antagonista” se refiere a un péptido o a un análogo P₁ que no mantiene la bioactividad del sustrato nativo de interés, o al menos a un nivel de actividad reducido en comparación con el sustrato nativo, e inhibe la acción biológica del sustrato nativo.

[0038] El término “análogo” se refiere a una molécula sustancialmente similar en función a la molécula receptora completa o un fragmento de la misma.

[0039] El término “derivado con modificaciones menores” con respecto a un compuesto químico original, por ejemplo un análogo de aminoácido, se usa para referirse a compuestos que son similares químicamente a los compuestos químicos originales. Preferiblemente, un derivado con modificaciones menores tendrá modificaciones estructurales menores y, por tanto, se puede considerar “análogo estructural” del compuesto original.

[0040] Las “enfermedades relacionadas con el corazón” incluyen cualquier evento patológico crónico o agudo que tenga que ver con el corazón y/o tejido asociado (p.ej., el pericardio, la aorta y otros vasos sanguíneos asociados), incluyendo la lesión de isquemia y reperfusión; insuficiencia cardíaca congestiva; paro cardíaco; infarto de miocardio; cardiotoxicidad causada por compuestos como medicamentos (p.ej. doxorubicina, herceptina, tioridazina y cisaprida); daño cardíaco debido a infección parasitaria (bacterias, hongos, rickettsiae, y virus, p.ej., sífilis, infección crónica por Trypanosoma cruzi); almieloidosis cardíaca fulminante; cirugía cardíaca; trasplante de corazón; lesión traumática del corazón (p.ej., lesión cardíaca contundente o penetrante, y rotura de la válvula aórtica); reparación quirúrgica de aneurisma de aorta

torácica; una aneurisma de aorta suprarrenal; shock cardiogénico debido a infarto de miocardio o insuficiencia cardiaca; shock neurogénico y anafilaxis.

[0041] Las “instrucciones” según el uso aquí realizado significan la etiqueta del producto y/o los documentos que describen los materiales o metodologías relevantes que conciernen al uso de un kit o producto farmacéutico envasado. Estos materiales pueden incluir cualquier combinación de los elementos siguientes: información general, lista de componentes, dosis propuestas, advertencias en relación a los posibles efectos secundarios, instrucciones para la administración del medicamento, asistencia técnica, y cualquier otro documento relacionado.

[0042] La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea aquí para referirse a aquellos ligandos, materiales, composiciones, y/o dosis que son, dentro del ámbito de un juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales, sustancialmente no pirogénicos, sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, compatible con una relación beneficio/riesgo razonable.

[0043] La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” según el uso aquí realizado significa un material, composición o vehículo aceptable farmacéuticamente, como un líquido o relleno sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulamiento, implicado en el desplazamiento o transporte de las sustancias químicas en cuestión de un órgano u otra parte del cuerpo, a otro órgano u otra parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, no perjudicial para el paciente y sustancialmente no pirogénico. Algunos ejemplos de materiales que pueden actuar como portadores farmacéuticamente aceptables son: (1) azúcares, como la lactosa, glucosa, y sacarosa; (2) almidones, como el almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosas, y sus derivados, como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, como propilenglicol; (11) polioles, como glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; (12) ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) sustancias tampón, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) agentes tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En algunos modos de realización, las composiciones farmacéuticas de

la presente invención son no pirogénicas, es decir, no inducen aumentos de temperatura significativos cuando se administran al paciente.

5 **[0044]** El término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales de adición de ácido orgánico e inorgánico, relativamente no tóxico del inhibidor o inhibidores. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final del inhibidor o inhibidores, o haciendo reaccionar por separado un inhibidor/-es purificado en forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen el bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, 10 estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naphthylate, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y sales de lauril sulfonato, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J, Pharm. Sci. 66:1-19)

15 **[0045]** En otros casos, los inhibidores útiles en los métodos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales de ácidos y, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de base orgánica o inorgánica relativamente no tóxica del inhibidor o inhibidores. Estas sales pueden prepararse de forma similar *in situ* durante el 20 aislamiento y purificación final del inhibidor/-es, o haciendo reaccionar por separado el inhibidor/-es purificado en su forma libre de ácidos con una base adecuada, como el hidróxido, carbonato, o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina primaria, secundaria, o terciaria, orgánica y farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinotérreas o alcalinas representativas 25 incluyen el litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y sales de aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., *supra*).

30 **[0046]** El término “prevenir” se reconoce en la técnica, y cuando se usa en relación con una afección, como una recidiva local (p.ej. dolores), una enfermedad como el cáncer, un síndrome complejo como una insuficiencia cardíaca o cualquier otra afección médica, se entiende comúnmente en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retrasa la aparición de, síntomas de una afección médica en un sujeto en comparación con un sujeto que no ha recibido la 35 composición. Así, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir el número de tumores cancerosos detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico en comparación con una población de control no tratada, y/o

retrasar la aparición de tumores cancerosos detectables en una población tratada frente a una población de control no tratada, por ejemplo, mediante una cantidad significativa estadísticamente y/o clínicamente. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada frente a una población de control no tratada, y/o retrasar la aparición de síntomas de la infección en una población tratada frente a una población de control no tratada. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o alternativamente retrasar, sensaciones de dolor sufridas por los sujetos de una población tratada frente a una población de control no tratada.

5
10 **[0047]** Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un compuesto, p.ej., un análogo de polipéptido o péptido de la presente invención, con respecto a su uso en un tratamiento, se refiere a una cantidad de polipéptido o péptido en una preparación que, al administrarla como parte de un régimen de dosis deseado (a un mamífero, preferentemente un humano) alivia los síntomas, mejora la afección, o ralentiza la aparición de la enfermedad según los estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección que se debe tratar o la finalidad cosmética, p.ej., con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

15
20 **[0048]** El término “alquilo”, se refiere a un radical de una cadena de carbono ramificada o no ramificada plenamente saturada que tiene un número de átomos de carbono específico, o hasta 30 átomos de carbono si no se realiza especificación alguna. Por ejemplo, un “alquilo inferior” se refiere a un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, y octilo, y aquellos que son isómeros de posición de estos alquilos. Los alquilos de 10 a 30 átomos de carbono incluyen decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonodecilo, eicosilo, henecosilo, docosilo, tricosilo y tetracosilo. En modos de realización preferidos, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene 30 átomos de carbono o menos en su cadena principal (p.ej., C₁-C₃₀ para cadenas lineales, C₃-C₃₀ para cadenas ramificadas), y más preferentemente 20 o menos. De forma similar, los cicloalquilos preferidos tienen de 3-
25
30 10 átomos de carbono en su estructura anular, y más preferiblemente tienen 5, 6, o 7 carbonos en la estructura anular.

[0049] Además, el término “alquilo” (o “alquilo inferior”) según su uso en la descripción, ejemplo, y reivindicaciones, desea incluir tanto cadenas de alquilo no sustituidas como sustituidas, refiriéndose las últimas a fracciones de alquilo que tienen sustituyentes reemplazando un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal del hidrocarburo. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidróxilo, un carbonilo (como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo),
35

un tiocarbonilo (como un tioéster, un tioacetato, o un tioformato) un alcoilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, un ciano, un nitro, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un fragmento aromático o heteroaromático. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que los fragmentos sustituidos en la cadena hidrocarburo pueden ser sustituidos ellos mismos, si fuera conveniente. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y grupos sililo, así como también éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y ésteres), $-CF_3$, $-CN$ y similares. Se describen más adelante alquilos sustituidos ejemplares. Los cicloalquilos pueden ser sustituidos además con alquilos, alquenilos, alcoilos, alquiltios, aminoalquilos, alquilos carbonilo sustituidos, $-CF_3$, $-CN$, y similares.

[0050] A menos que el número de carbonos se especifique de otra manera, “alquilo inferior”, según el uso aquí realizado, significa un grupo alquilo, como se ha definido arriba, pero que tiene de uno a diez carbonos, más preferentemente de uno a seis átomos de carbono en su cadena principal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, y terc-butilo. Del mismo modo, un “alquenilo inferior” y “alquilino inferior” tienen longitudes de cadena similares. A lo largo de la solicitud, los grupos alquilo preferidos son alquilos inferiores. En los modos de realización preferidos, un sustituyente designado aquí como alquilo es un alquilo inferior.

[0051] El término “carbociclo”, según el uso aquí realizado, se refiere a un anillo aromático o no aromático en el que cada átomo del anillo es carbono.

[0052] El término “arilo”, según su uso aquí, incluye los grupos aromáticos de anillo simple de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Aquellos grupos arilo que tengan heteroátomos en la estructura anular también pueden denominarse “heterociclos arilo” o “heteroaromáticos”. El anillo aromático puede ser sustituido en una o más posiciones del anillo con tales sustituyentes según se ha descrito arriba, por ejemplo, halógeno, azido, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, fragmentos aromáticos o heteroaromáticos, $-CF_3$, $-CN$, o similares. El término “arilo” también incluye sistemas de anillo policíclico que tienen dos o más anillos cíclicos en los cuales dos o más carbonos son comunes a dos anillos colindantes (los anillos son “anillos fusionados”)

en los que al menos uno de los anillos es aromático, p.ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos.

[0053] Un “alquenilo” hace referencia a cualquier radical de una cadena de carbono no saturada ramificada o no ramificada que tiene un número de átomos de carbono específico, o hasta 26 átomos de carbono si no se especifica un límite en el número de átomos de carbono; y que tiene 1 o más enlaces dobles en el radical. El alquenilo, de entre 6 y 26 átomos de carbono queda ejemplificado por hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, undecenilo, dodenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo, octodocenilo, nonadecenilo, eicosenilo, heneicosenilo, docosenilo, tricosenilo y tetrasenilo, en sus diversas formas isoméricas, en los que el enlace o enlaces no saturados pueden localizarse en cualquier sitio del radical y pueden tener la configuración (Z) o la (E) sobre los enlaces dobles.

[0054] El término “alquinilo” se refiere a radicales hidrocabrilos del ámbito del alquenilo, pero que tienen uno o más enlaces triples en el radical.

[0055] Los términos “alcoxilo” o “alcoxi” según su uso aquí se refieren a un grupo alquilo, como se define más adelante, que tiene un radical de oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, terc-butoxi y similares. Un “éter” son dos hidrocarburos unidos de manera covalente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que convierte ese alquilo en un éter es o se parece a un alcoxilo, como puede representarse por cualquiera de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R₁, donde m y R₁ se describen más adelante.

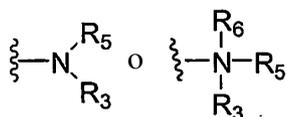
[0056] El término “heterociclilo” o “grupo heterociclilo” se refiere a estructuras anulares de 3 a 10 miembros, más preferentemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras anulares incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policiclos. Los grupos heterociclicos incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiino, pirrolo, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazan, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas, y similares. El anillo heterocíclico puede ser sustituido en una o más posiciones con los sustituyentes arriba descritos, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, sulfamoilo, sulfinilo, éter, alquiltio, sulfonilo,

cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un fragmento aromático o heteroaromático, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$, o similares.

[0057] El término “alquiltio” se refiere a un grupo alquilo, como se define arriba, que tienen un radical de azufre unido al mismo. En los modos de realización preferidos, el fragmento de “alquiltio” se representa por uno de $-(\text{S})$ -alquilo, $-(\text{S})$ -alquenilo, $-(\text{S})$ -alquinilo, y $-(\text{S})-(\text{CH}_2)_m\text{-R}_1$, en el que m y R_1 se definen más adelante. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio, y similares.

[0058] Según el uso aquí realizado, el término “nitro” significa $-\text{NO}_2$; el término “halógeno” designa F, Cl, Br, o I; el término “sulfhidrilo” significa $-\text{SH}$; el término “hidroxilo” significa $-\text{OH}$; y el término “sulfonilo” significa $-\text{SO}_2$.

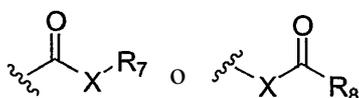
[0059] Los términos “amina” y “amino” son reconocidos en la técnica y se refieren a aminas sustituidas o no sustituidas, p.ej., un fragmento puede estar representado por las fórmulas generales:



15

en las que R_3 , R_5 y R_6 representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(\text{CH}_2)_m\text{-R}_1$, o R_3 y R_5 junto con el átomo N al que se encuentran unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R_1 representa un alquenilo, arilo, cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclilo o un policiclilo; y m es cero o un entero en el intervalo de 1 a 8. En los modos de realización preferidos, solo uno de R_3 o R_5 puede ser un carbonilo, p.ej., R_3 , R_5 y el nitrógeno juntos no forman una imida. En los modos de realización aún más preferidos, R_3 y R_5 (y opcionalmente R_6) representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, o $-(\text{CH}_2)_m\text{-R}_1$. De ese modo, el término “alquilamina”, según el uso aquí realizado, significa un grupo amina, según se ha definido arriba, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido al mismo, es decir, al menos uno de R_3 y R_5 es un grupo alquilo. En determinados modos de realización, un grupo amino o una alquilamina es básica, lo que significa que tiene un $\text{pK}_a \geq 7,00$. Las formas protonadas de estos grupos funcionales tienen pK_a s en relación con el agua por encima de 7,00.

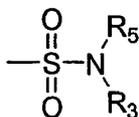
[0060] El término “carbonilo” es reconocido en la técnica e incluye aquellos fragmentos que pueden ser representados por la fórmula general:



en el que X es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R₇ representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, -(CH₂)_m-R₁ o una sal farmacéuticamente aceptable, R₈ representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o -(CH₂)_m-R₁, donde m y R₁ corresponden a las definiciones arriba realizadas. Cuando X es un oxígeno y R₇ o R₈ no son hidrógeno, la formula representa un “éster”. Cuando X es un oxígeno, y R₇ sigue la definición anterior, el fragmento se denomina aquí como grupo carboxilo, y específicamente cuando R₇ es un hidrógeno, la fórmula representa un “ácido carboxílico”. Cuando X es un oxígeno, y R₈ es hidrógeno, la fórmula representa un “formiato”. En general, cuando el átomo de oxígeno de la fórmula anterior es sustituido por azufre, la fórmula representa un grupo “tiocarbonilo”. Cuando X es un azufre y R₇ o R₈ no son hidrógeno, la fórmula representa un grupo “tioéster”. Cuando X es un azufre y R₇ es hidrógeno, la fórmula representa un grupo “ácido tiocarboxílico”. Cuando X es un azufre y R₈ es hidrógeno, la fórmula representa un grupo “tioformato”. Por otro lado, cuando X es un enlace, y R₇ no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo “cetona”. Cuando X es un enlace, y R₇ es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo “aldehído”.

[0061] Según el uso aquí realizado, el término “sustituido” incluye todos los sustituyentes aceptables de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes aceptables incluyen sustituyentes de compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, por ejemplo, los descritos arriba en el presente texto. Los sustituyentes aceptables pueden ser uno o más, y el mismo o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente aceptable de compuestos orgánicos aquí descrito que satisfaga las valencias de los heteroátomos. Esta invención no pretende estar limitada de ningún modo por los sustituyentes aceptables de compuestos orgánicos. Se entenderá que “sustitución” o “sustituido con” incluye la condición implícita de que tal sustitución sea acorde con la valencia aceptable del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, p.ej., que no sufre transformación de manera espontánea como por reorganización, ciclización, eliminación, etc.

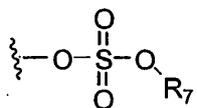
[0062] El término “sulfamoilo” es reconocido en la técnica e incluye un fragmento que puede representarse por la fórmula general:



35

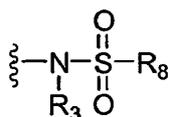
en la que R₃ y R₅ siguen la definición arriba aportada.

[0063] El término “sulfato” es reconocido en la técnica e incluye un fragmento que puede representarse por la fórmula general:



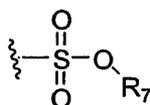
5 en el que R₇ sigue la definición arriba aportada.

[0064] El término “sulfamido” es reconocido en la técnica e incluye un fragmento que puede representarse por la fórmula general:



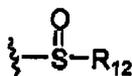
en el que R₂ y R₄ sigue la definición arriba aportada.

10 **[0065]** El término “sulfonato” es reconocido en la técnica e incluye un fragmento que puede representarse por la fórmula general:



en el que R₇ es un par de electrones, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, o arilo.

15 **[0066]** Los términos “sulfoxido” o “sulfínilo”, según el uso aquí realizado, se refieren a un fragmento que puede representarse por la fórmula general:



en el que R₁₂ es elegido del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, aralquilo, o arilo.

20 **[0067]** Se pueden realizar sustituciones análogas de grupos alquenil o alquinil para producir, por ejemplo, aminoalquenilos, aminoalquinilos, amidoalquenilos, amidoalquinilos, iminoalquenilos, iminoalquinilos, tioalquenilos, tioalquinilos, alquenilos carbonil-sustituidos o alquinilos carbonilo sustituidos.

25 **[0068]** Según el uso aquí realizado, la definición de cada expresión, p.ej., alquilo, m, n, etc., cuando aparece más de una vez en cualquier estructura, se pretende que sea independiente de su definición en cualquier otro sitio en la misma estructura.

30 **[0069]** Para los fines de esta invención, los elementos químicos están identificados según la Tabla Periódica de Elementos, versión CAS. Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87, interior de la cubierta. También para los fines de esta invención, el término “hidrocarburo” está previsto que incluya todos los compuestos aceptables que tengan al menos un átomo de hidrógeno y un átomo de carbono. En un aspecto amplio, los hidrocarburos aceptables incluyen compuestos orgánicos

aromáticos y no aromáticos, carbocíclicos y heterocíclicos, ramificados y no ramificados, cíclicos y acíclicos que pueden ser sustituidos o no sustituidos.

III. Proteínas ejemplares a título informativo

(a) Análogos P₁

5 **[0070]** La presente invención facilita la fabricación y el uso de análogos péptidos y P₁,
resistentes a la escisión mediada por proteinasas. Dado un polipéptido nativo
típicamente escindido por una proteinasa determinada (p.ej., una metaloproteinasa,
una cisteína proteinasa, una proteinasa aspártica, o una serina proteinasa), se puede
determinar fácilmente el lugar dentro del polipéptido nativo en el que rompe la
10 proteinasa (lugar de escisión o rotura). Una vez se ha identificado el lugar de escisión,
pueden fabricarse fácilmente análogos P₁ según los métodos de la presente
invención. Dado el profundo entendimiento en enzimología, se conocen los sitios de
escisión preferidos de un gran número de proteinasas, y la indentificación de un sitio
de escisión consensuado en un polipéptido nativo dado puede lograrse rápida y
15 fácilmente mediante el simple examen de la secuencia de aminoácidos.

[0071] En el caso de que no se conozca el sitio de rotura en una polipéptido particular
o no se pueda determinar de forma rápida simplemente mediante examen de la
secuencia de aminoácidos, el sitio de rotura puede determinarse simplemente
incubando el polipéptido nativo y la proteinasa para permitir la rotura, separar las
20 especies de polipéptido rotas (p.ej., por electroforesis) y secuenciar los fragmentos
péptidos rotos. Mediante la determinación de la secuencia de los extremos del
fragmento péptido roto, y comparando esta secuencia con la secuencia de polipéptido
completa, se puede identificar y verificar rápida y fácilmente el sitio de rotura en el
polipéptido nativo en el que actúa una proteinasa.

25 **[0072]** Se proporciona otro método ejemplar para determinar rápidamente la
especificidad del sustrato de una proteinasa, por ejemplo, en la Publicación PCT
WO0061789.

[0073] La presente invención proporciona métodos generalizables para fabricar
análogos P₁ resistentes a la proteinasa. La presente invención contempla el diseño y
30 uso de análogos P₁ resistentes a metaloproteinasa, cisteína proteinasas, proteinasas
aspárticas, y serina proteinasas. Por ejemplo, los análogos en cuestión pueden
volverse resistentes a la rotura por proteinasas elegidas de: una aminopeptidasa (EC
3.4.11.-), una dipeptidasa (EC 3.4.13.-), una dipeptidil-peptidasa o tripeptidil peptidasa
(EC 3.4.14.-), una peptidil-dipeptidasa (EC 3.4.15.-), una carboxipeptidasa de tipo
35 serina (EC 3.4.16.-), una metalocarboxipeptidasa (EC 3.4.17.-), una carboxipeptidasa
de tipo cisteína (EC 3.4.18.-), una omegapeptidasa (EC 3.4.19.-), una serina
proteinasa (EC 3.4.21.-), una cisteína proteinasa (EC 3.4.22.-), una proteinasa

aspártica (EC 3.4.23.-), una metaloproteinasa (EC 3.4.24.-), o una
 proteinasa de mecanismo desconocido (EC 3.4.99.-). La designación EC que sigue a
 cada clase de proteinasa es la utilizada por recomendación de la Unión Internacional
 de Bioquímica y Biología Molecular (1984), y estos títulos de subclases se
 5 proporcionan aquí para referencia.

[0074] Para continuar ilustrando las proteinasas ejemplares para las que se
 contemplan los análogos P₁ resistentes a la proteinasa, una lista no exhaustiva de
 proteinasas incluye: leucil-aminopeptidasa, alanin-aminopeptidasa de membrana,
 cistinil-aminopeptidasa, tripéptido aminopeptidasa, prolil-aminopeptidasa,
 10 aminopeptidasa B, glutamil-aminopeptidasa, Xaa-Pro aminopeptidasa, leucil-
 aminopeptidasa bacteriana, clostridial aminopeptidasa, alanil-aminopeptidasa citosol,
 lisil-aminopeptidasa, Xaa-Trp aminopeptidasa, triptofanil-aminopeptidasa, metionil-
 aminopeptidasa, D-estereoespecífica aminopeptidasa, aminopeptidasa Ey,
 aminopeptidasa vacuolar I, Xaa-His dipeptidasa, Xaa-Arg dipeptidasa, Xaa-metil-His
 15 dipeptidasa, Cys-Gly dipeptidasa, Glu-Glu dipeptidasa, Pro-Xaa dipeptidasa, Xaa-Pro
 dipeptidasa, Met-Xaa dipeptidasa, dipeptidasa no estereoespecífica, dipeptidasa
 citosol no específica, dipeptidasa de membrana, Beta-Ala-His dipeptidasa, dipeptidil-
 peptidasa I (DPP I), dipeptidil-peptidasa II (DPP II), dipeptidil-peptidasa III (DPP III),
 dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV), dipeptidil-dipeptidasa, tripeptidil-peptidasa I,
 20 tripeptidil-peptidasa II, Xaa-Pro dipeptidil-peptidasa, peptidil-dipeptidasa A, peptidil-
 dipeptidasa B, peptidil-dipeptidasa Dcp, Pro-X carboxipeptidasa lisosomal, D-Ala-D-Ala
 carboxipeptidasa tipo serina, carboxipeptidasa C, carboxipeptidasa D,
 carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, lisina (arginina) carboxipeptidasa, Gly-X
 carboxipeptidasa, alanina carboxipeptidasa, muramoilpentapéptido carboxipeptidasa,
 25 carboxipeptidasa H, glutamato carboxipeptidasa, carboxipeptidasa M,
 muramoiltetrapéptido carboxipeptidasa, zinc D-Ala D-Ala carboxipeptidasa,
 carboxipeptidasa A2, Pro-X carboxipeptidasa de membrana, tubulinil-Tyr
 carboxipeptidasa, carboxipeptidasa T, carboxipeptidasa 1 termoestable,
 carboxipeptidasa U, glutamato carboxipeptidasa II, metalocarboxipeptidasa D,
 30 carboxipeptidasa de tipo cisteína, acilaminoacil-peptidasa, peptidil-glicinamida,
 piroglutamil-peptidasa I, beta-aspartil-peptidasa, piroglutamil-peptidasa II, N-
 formilmetionil-peptidasa, pteroilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa, gamma-
 glutamil hidrolasa, gamma-D-glutamil-meso-diaminopimelato peptidasa I,
 quimotripsina, quimotripsina C, metridina, tripsina, trombina, factor de coagulación Xa,
 35 plasmina, enteropeptidasa, acrosina, alfa-líftico endopeptidasa, glutamil endopeptidasa,
 catepsina G, factor de coagulación VIIa, factor de coagulación IXa, cucumisina, prolil-
 oligopeptidasa, factor de coagulación XIa, brachyurin, calicreína plasmática, calicreína

de tejido, elastasa pancreática, elastasa de leucocito, factor de coagulación XIIa, quimasa, componente del complemento C1r, componente del complemento C1s, convertasa del complemento C3/C5 de la vía clásica, factor I de complemento, factor D del complemento, convertasa del complemento C3/C5 de vía alternativa, cerevisin, 5 hipodermina C, lisil-endopeptidasa, endopeptidasa La, gamma-renina, venombina AB, leucil-endopeptidasa, triptasa, escutelarina, kexina, subtilisina, orizina, proteinasa K, termomicolina, termitasa, endopeptidasa So, activador del t-plasminógeno, proteína C (activada), endopeptidasa pancreática E, elastasa pancreática II, endopeptidasa de serina específica de IgA, activador del U-plasminógeno, venombina 10 A, furina, mieloblastina, semenogelasa, granzima A, granzima B, estreptogrisina A, estreptogrisina B, glutamil-endopeptidasa II, oligopeptidasa B, limulus factor de coagulación C, limulus factor de coagulación B, limulus enzima de coagulación, omptina, represor lexA, señal-peptidasa I, togavirina, flavirina, endopeptidasa C1p, proproteína convertasa 1, proproteína convertasa 2, activador del factor V del veneno 15 de las serpientes, lactocepina, catepsina B, papaína, ficaína, quimopapaína, asclepaína, clostripaína, estreptopaína, actinidaína, catepsina L, catepsina H, calpaína, catepsina T, glicil-endopeptidasa, procoagulante del cáncer, catepsina S, picornaína 3C, picornaína 2A, caricaína, ananaína, bromelina del tallo, bromelina de la fruta, legumaína, histolisaína, caspasa-1, gingipaína R, catepsina K, pepsina A, 20 pepsina B, gastricsina, quimosina, catepsina D, nepentesina, renina, retropepsina, enzima convertidora pro-opiomelanocortina, aspergiloepsina I, aspergiloepsina II, peniciloepsina, rizopuspepsina, endotiaepsina, mucorpepsina, candidapepsina, saccharoepsina, rodotorulapepsina, fisaropepsina, acrocilindroepsina, poliporoepsina, picnoroepsina, escitalidoepsina A, escitalidoepsina B, 25 xantomonapepsina, catepsina E, barrierpepsina, señal-peptidasa II, pseudomonapepsina, plasmepsina I, plasmepsina II, fitepsina, atrolisina A, collagenasa microbiana, leucolisina, collagenasa intersticial, neprilisina, envelisina, metaloendopeptidasa específica de IgA, N-endopeptidasa de procolágeno, oligopeptidasa thimet, neurolysinina, estromelisina, 1, meprina, A, C-endopeptidasa de 30 procolágeno, peptidil-Lys metaloendopeptidasa, astacina, estromelisina 2, matrilisina, gelatinasa A, aeromonolisina, pseudolisina, termolisina, bacilolisina, aureolisina, cocolisina, micolisina, beta-lítico metaloendopeptidasa, peptidil-Asp metaloendopeptidasa, neutrofilo collagenasa, gelatinasa B, leismanolisina, saccharolisina, autolisina, deuterolisina, serralisina, atrolisina B, atrolisina C, atroxasa, 35 atrolisina E, atrolisina F, adamalisina, horrolisina, ruberlisina, botropasina, botrolisina, opiolisina, trimerelisina I, trimerelisina II, mucrolisina, pitrilisina, insulisinina, O-sialoglicoproteína endopeptidasa, ruselisina, peptidasa de intermedio mitocondrial,

dactilisina, nardilisina, magnolisina, meprina B, peptidasa de procesado mitocondrial, elastasa de macrófago, coriolisina L, coriolisina H, tentoxilisina, bontoxilisina, oligopeptidasa A, enzima de conversión de endotelina I, fibrolasa, jararhagina, fragilisina, complejo de endopeptidasa multicatalítico.

- 5 **[0075]** La presente invención muestra una secuencia polipeptídica que codifica un análogo resistente a la proteinasa de una hormona polipeptídica que tiene una secuencia N-terminal elegida de $\text{NH}_2\text{-xaa-Ala-Yaa}$ y $\text{NH}_2\text{-Xaa-Pro-Yaa}$, donde Xaa y Yaa representan cada una independientemente un residuo de aminoácido. En determinadas áreas, Xaa es un aminoácido con una cadena lateral aromática. En
- 10 determinadas áreas, Xaa es seleccionado de entre histidina, tirosina, triptófano, y fenilalanina. En determinadas áreas, Yaa es un residuo de aminoácido con una cadena lateral ácida. En determinadas áreas, Yaa, es seleccionado de entre ácido aspártico y ácido glutámico.

15 Tabla 1: Análogos ejemplares de sustratos de DPP IV

	Secuencia nativa	Análogo ejemplar
Péptido similar al glucagón humano GLP-1(7-37)	HAE*GTFITSDVSSYLEGQ AAKEFLAWLVKGR_Q	HAXGTFITSDVSSYLEGQA AKEFLAWLVKGR_G
Péptido similar al glucagón humano 1: GLP-1 (7-36) NH_2	HAE*GTFITSDVSSYLEGQ AAKEFLAWLVKGR-NH_2	HAXGTFITSDVSSYLEGQA AKEFLAWLVKGR-NH_2
Péptido similar al glucagón humano 2, GLP-2	HAD*GSFSDMENTILDNL AARDFINWLIQTKITD	HAXGSFSDMENTILDNLA ARDFINWLIQTKITD
Polipéptido insulínico dependiente de la glucosa humano, GIP	YAE*GTFISDYSIAMDKI HQQDFVNWLLAQKGGKNDWKH NTTQ	YAXGTFISDYSIAMDKIHQ QDFVNWLLAQKGGKNDWKHNT Q
Neuropéptido humano Y, NPY	YPS*KPDNPGEDAPAED MARYYSALRHYINLITRORY	YPXKPDNPGEDAPAEDM ARYYSALRHYINLITRORY

	Secuencia nativa	Análogo ejemplar
Polipéptido pancreático humano PP	APL*EPVYFGDNATPEQ MAQYAADLRRY	APXEPVYFGDNATPEQMA QYAADLRRY
Péptido humano YY	YPI*KPEAPGEDASPEEL NRYAASLRHYLNLVTRORY	YPXKPEAPGEDASPEELN RYAASLRHYLNLVTRORY
exendin-4 (análogo de GLP-1)	HGE*GITFTSDLSKEMBBE AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS- NH ₂	HGXGITFTSDLSKEMBBEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂
exendin-3 (análogo de GLP-1)	HSD*GITFTSDLSKQMBEE AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	HSXGITFTSDLSKQMBEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

[0076] En determinados modos de realización de los análogos de GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36)NH₂, GLP-1 (7-36)-Exendin cola-NH₂, y exendin-3, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II). En modos de realización preferidos, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II) en el que R₁ y R₂ representan cada uno de manera independiente un metilo, etilo o propilo. En el modo de realización más preferido, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II), en el que R₁ y R₂ son metilo, y R₃ es seleccionado de entre -COOH y -CH₂-COOH.

[0077] En determinados modos de realización preferidos de análogos de exendin-4, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II). En los modos de realización preferidos, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II) en el que R₁ y R₂ representan cada uno de manera independiente metilo, etilo o propilo, y R₃ representa -(CH₂)_m-C(=O)NH₂ (en el que m es 0, 1 ó 2). En el modo de realización más preferido, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula (II), en el que ambos R₁ y R₂ son metilo, y R₃ representa (CH₂)-C(=O)NH₂.

[0078] Más generalmente, la presente invención contempla específicamente la generación de análogos para factores peptídicos y polipeptídicos que tienen una secuencia de aminoácidos

Xaa-Ala-Yaa-R o Xaa-Pro-Yaa-R'

en la que Xaa y Yaa representan residuos de aminoácidos, y R y R', de manera independiente en cada caso, representan cadenas de polipéptidos que comprenden de 1 a 100 residuos de aminoácidos y en la que en la secuencia análoga Yaa es reemplazado por un residuo de aminoácido representado por la Fórmula I o la Fórmula

5 II. La invención también contempla la modificación de polipéptidos alternativos que difiere en su secuencia del polipéptido natural para producir análogos P', alternativos. Tales alternativas son idénticas al polipéptido natural al menos en un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o más de un 99%.

En determinados modos de realización, R es un polipéptido que tiene una secuencia

10 de aminoácidos seleccionada de entre el grupo compuesto por:

GTFTSDVSSYLEGQAAKEFrAWLVKGR,

GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH₂,

GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂, y

o una secuencia que difiere en 5 o menos residuos de aminoácidos del mismo, incluso

15 más preferiblemente difiere en 4 residuos de aminoácidos como máximo, 3 o incluso 2.

[0079] En numerosos modos de realización, el análogo se elegirá de manera que conserve una o más de la actividad *in vitro* o *in vivo* del sustrato nativo. Las actividades *in vitro* o *in vivo* pueden medirse utilizando cualquier protocolo disponible para una persona de experiencia ordinaria que sea apropiado para el polipéptido

20 concreto. Los ejemplos de actividades funcionales que pueden medirse para asegurar si un análogo de GLP-1 mantiene la misma actividad funcional o similar incluyen la capacidad del polipéptido para unirse a su receptor o receptores en ensayos celulares o ensayos libres de células, la capacidad del polipéptido para inducir una carga (p.ej., proliferación, diferenciación, supervivencia, crecimiento, migración, etc) en una célula

25 sensible al polipéptido, la capacidad del polipéptido de modular la expresión de uno o más genes o proteínas en una célula sensible al polipéptido.

[0080] En determinados modos de realización, el análogo tiene una actividad sustancialmente similar a la del polipéptido nativo (p.ej., aproximadamente tan activo como el polipéptido nativo en un 80%, 90%, 100%, 110% o 120%). En algunos modos

30 de realización, el análogo es menos activo que el polipéptido nativo (p.ej., aproximadamente tan activo como el polipéptido nativo en un 50%, 60%, 70%, o 75%). Observamos que un análogo que es algo menos activo puede ser útil, como *in vivo* o en un cultivo celular, si la disminución en la actividad todavía proporciona la capacidad de proporcionar una concentración localizada suficiente de análogo durante un periodo

35 de tiempo suficiente. De este modo, un aumento en la vida media obtenido por resistencia a la proteinasa puede compensar la disminución en la actividad causada por la construcción del análogo. En otro modo de realización, el análogo es más activo

que el polipéptido nativo (p.ej., tan activo como el polipéptido nativo en aproximadamente un 130%, 150%, 175%, 200%, 300%, 500%, 800%, o incluso un 1000%). En cualquiera de los anteriores, con “actividad” se hace referencia a una o más funciones del polipéptido nativo. Por ejemplo, una actividad (p.ej., una función biológica) de un polipéptido puede ser la unión a receptores, interacción del cofactor, capacidad de unirse a ADN, capacidad de actuar como activador o represor transcripcional, la capacidad de participar en una vía de transducción de señales particular, y la capacidad de influir en el comportamiento celular (p.ej., proliferación, diferenciación, supervivencia, o migración).

5
10 **[0081]** Tales actividades pueden expresarse, por ejemplo, como constantes de unión relativa (como para la unión del receptor), concentraciones efectivas (EC_{50}) y/o dosis efectivas (ED_{50}).

[0082] Los análogos de GLP-1 ejemplares tienen una vida media aumentada en comparación con el polipéptido nativo (*in vitro* y/o *in vivo*) debido a la resistencia de los análogos de GLP-1 a una proteinasa que normalmente rompe el polipéptido nativo. Sin embargo, se apreciará generalmente que diversos análogos de GLP-1 tendrán vidas medias diferentes (así como un cambio diferente en la vida media en comparación con el polipéptido nativo). La vida media *in vivo* o *in vitro* puede medirse fácilmente por una persona con experiencia en la materia utilizando métodos estándares. En determinados modos de realización, el análogo tiene una vida media *in vitro* o *in vivo* que es aproximadamente un factor de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,3; 1,5; 2; 3; 5; 10; 25; 30; 50; 75; 100, o incluso más de 100 veces la vida media *in vivo* y/o *in vitro* del polipéptido nativo en condiciones de ensayo de medición de la vida media similares.

(b) Síntesis de los análogos de hormonas peptídicas

25 **[0083]** Los péptidos de la invención pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida estándar. Véase, o.g., Stewart, J.M., et al., Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co. 2d ed. 1984).

[0084] Los análogos de la invención pueden prepararse utilizando técnicas en fase sólida estándares para la síntesis de péptidos. Como es sabido, los péptidos de la longitud necesaria pueden prepararse usando un equipo y reactivos disponibles en el mercado y siguiendo las instrucciones del fabricante para bloquear cualquier grupo que trate de interferir, protegiendo el aminoácido que se hará reaccionar, el acoplamiento, desprotección y limitación de los residuos sin reaccionar. El equipo adecuado puede obtenerse, por ejemplo, de Applied BioSystems en Foster City, Calif., o Biosearch Corporation en San Raphael, Calif.

35 **[0085]** En un modo de realización preferido, los péptidos se sintetizan utilizando los protocolos de síntesis en fase sólida automatizados estándares que emplean t-

butoxicarbonil-alfa-aminoácidos con la protección de la cadena lateral adecuada. El péptido completado se elimina del apoyo de fase sólida con una desprotección de cadena lateral simultánea utilizando el método estándar de fluoruro hidrógeno. Los péptidos crudos se purifican mediante HPLC semipreparativa de fase inversa (Vydac C₁₈) utilizando gradientes de acetonitrilo en 0,1% ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés). Los péptidos se secan al vacío para eliminar el acetonitrilo y son liofilizados de la solución de 0,1% ácido trifluoroacético en agua. Se verifica la pureza mediante HPLC-RP analítico. Los péptidos pueden ser liofilizados y después solubilizados en agua o en 0,01M de ácido acético en concentraciones de 1-2 mg/mL por peso.

[0086] El uso de los métodos de síntesis arriba mencionados es necesario si se producen en los péptidos aminoácidos no codificados o aminoácidos en la forma D. Sin embargo, para péptidos que se encuentran codificados por genes, se puede recurrir también a las técnicas recombinantes utilizando secuencias de ADN fácilmente sintetizadas en sistemas de expresión disponibles en el mercado.

(c) Ensayos funcionales

[0087] Como se explica aquí en detalle, la presente invención proporciona una forma generalizable de fabricar análogos de GLP-1 resistentes a la proteinasa. Basándose en el conocimiento del lugar de rotura para un GLP-1, y en las orientaciones aquí proporcionadas para construir análogos resistentes a una proteinasa, se puede construir fácilmente un número de análogos de GLP-1 resistentes a la escisión por, por ejemplo, serina proteinasas, metaloproteinases, proteinasas aspárticas, y cisteína proteinasas. Una vez se ha fabricado el análogo de GLP-1 candidato, se puede medir fácilmente la actividad del análogo de GLP-1 (p.ej., si el análogo candidato es adecuado como sustrato de proteinasa) y compararla con la del polipéptido nativo.

[0088] Existe una amplia variedad de métodos en la técnica para evaluar si el análogo de GLP-1 candidato es resistente a la proteólisis. Por ejemplo, la capacidad de una proteinasa específica de romper un análogo de GLP-1 puede medirse en un sistema libre de células *in vitro*. En uno de tales modos de realización de un sistema de ensayo libre de células, el sustrato candidato (p.ej., un análogo de GLP-1 y/o un polipéptido nativo) es marcado en el extremo con una etiqueta detectable como la radioactividad. El sustrato etiquetado es incubado en presencia de proteinasa. Con el tiempo, las muestras de la mezcla de reacción pueden frenarse y aplicarse en un gel. Un cambio en el tamaño de la banda radioactiva indica que el polipéptido se escinde por la proteinasa, y la velocidad a la que ocurre este cambio indica la velocidad a la que el polipéptido es escindido por la proteinasa. Esta velocidad puede compararse con la observada con el polipéptido nativo.

[0089] Para una mayor ilustración, un experimento ejemplar para probar un análogo de GLP-1 particular puede incluir lo siguiente. El polipéptido nativo y el análogo de GLP-1 putativo se marcan cada uno de manera radioactiva (nota: para los fines del etiquetado, todo lo que se requiere es que la escisión del polipéptido produzca un fragmento radioactivo que difiera en tamaño con respecto al polipéptido marcado de longitud completa). El polipéptido nativo marcado y el análogo de GLP-1 son incubados con la proteinasa particular. Tras la incubación, el polipéptido nativo y el análogo de GLP-1 se separan mediante electroforesis en gel, y se examina la migración de las especies marcadas. Puesto que se sabe que la proteinasa específica rompe el polipéptido nativo, se esperaría ver un cambio en el tamaño del fragmento marcado del polipéptido nativo (antes y después de la incubación con la enzima), en el que el fragmento más pequeño corresponde al producto escindido. Sin embargo, si el análogo de GLP-1 es resistente a la proteólisis, este cambio en la movilidad tras la incubación con proteinasa no se producirá, o se producirá de una manera mucho más lenta que con la proteólisis de la proteína nativa.

[0090] La capacidad relativa de una proteinasa de escindir un análogo de GLP-1 en comparación con un polipéptido nativo también puede evaluarse en un sistema celular *in vitro*. En uno de tales ensayos celulares, una célula que expresa una proteinasa dada se pone en contacto con un polipéptido nativo o un análogo de GLP-1 de manera que el polipéptido nativo o el análogo de GLP-1 se exprese en la célula. Al igual que en el ensayo libre de células descrito arriba, el polipéptido nativo o el análogo de GLP-1 se etiqueta de manera detectable. La escisión del polipéptido nativo y el análogo de GLP-1 puede medirse y compararse mediante la extracción de proteína de las células y midiendo la migración de la proteína marcada.

[0091] En otro ejemplo de ensayo celular, se pone en contacto una célula que no expresa una proteína dada con un polipéptido nativo o un análogo de GLP-1 etiquetados de manera detectable, de manera que el polipéptido nativo o análogo de GLP-1 se expresan en la célula. La célula se conecta también con la proteinasa específica de manera que la proteinasa se expresa en la célula. La escisión del polipéptido nativo y el análogo de GLP-1 puede medirse y compararse mediante la extracción de proteína de las células y la medición de la migración de la proteína etiquetada.

[0092] En cualquiera de los ensayos celulares antes mencionados, la invención contempla el uso de un número de células primarias o líneas celulares. En algunos ejemplos, puede resultar ventajoso seleccionar una célula particular o línea celular en la que llevar a cabo un análisis *in vitro*. Por ejemplo, puede ser ventajoso en algunos casos seleccionar una línea celular que está más estrechamente relacionada con el

tipo celular en el que se desea usar finalmente el análogo de GLP-1. Sin embargo, en otros casos, puede ser más útil llevar a cabo una exploración y ensayo inicial del análogo de GLP-1 candidato en un tipo de célula o una línea celular posiblemente no relacionada elegidos fundamentalmente por conveniencia, y llegar a
5 cabo más tarde pruebas de seguridad y eficacia en líneas celulares más específicas o modelos animales según sea necesario.

[0093] Además de los ensayos celulares y los ensayos libres de células, la resistencia a la proteinasa de un análogo de GLP-1 específico puede medirse *in vivo* utilizando cualquiera de un número de modelos animales. La prueba inicial de la proteólisis de un
10 análogo de GLP-1 dado puede evaluarse en animales salvajes. Durante dicha prueba inicial, los efectos positivos o negativos potenciales del análogo P₁ no son la cuestión, sino que se trata de averiguar si el análogo P₁ específico es resistente a la proteólisis. Una vez se demuestra que un análogo de GLP-1 específico es resistente a la proteólisis utilizando cualquier ensayo libre de células, celular, o *in vivo* descrito
15 arriba, se pueden llevar a cabo otras pruebas *in vivo* e *in vitro* del análogo de GLP-1 para asegurar la eficacia terapéutica del análogo de GLP-1.

[0094] Se pueden usar ensayos adicionales para evaluar la actividad funcional específica de un análogo de GLP-1 resistente a la proteinasa. Tales ensayos pueden seleccionarse basándose en el análogo de GLP-1 específico. Por ejemplo, cuando el
20 polipéptido es un factor de crecimiento, la actividad funcional del análogo del factor de crecimiento puede evaluarse mediante la medición de la capacidad del factor de crecimiento de unirse a su receptor de factor de crecimiento en un ensayo libre de células o celular, y comparándolo con la capacidad del factor de crecimiento nativo. Cuando el polipéptido es una hormona peptídica, la actividad funcional del análogo de
25 la hormona peptídica puede evaluarse mediante la medición de la capacidad del análogo de la hormona peptídica de unirse a su receptor en un ensayo celular o libre de células, y comparándolo con la capacidad de la hormona peptídica nativa. Cuando el polipéptido es un factor de transcripción, la actividad funcional del análogo del factor de transcripción puede evaluarse midiendo la capacidad de unirse a una secuencia
30 consenso de ADN adecuada o la capacidad de activar una construcción indicadora que contenga una secuencia consenso adecuada, y comparar esta capacidad con la del factor de transcripción nativo. En cualquiera de estos ejemplos, la actividad funcional también puede medirse en modelos animales.

[0095] El siguiente ejemplo ilustrativo proporciona un método potencial de evaluar una
35 actividad funcional de análogos de análogos de GLP-1.

1. Ensayos de la actividad insulínica

[0096] Los péptidos GLP-1 activos, 7-34, 7-35, 7-36, y 7-37, presentan actividad insulínica, y la invención proporciona métodos para fabricar análogos de péptidos de estos péptidos GLP-1 activos. La resistencia de los análogos de péptidos GLP-1 a la proteólisis puede medirse fácilmente. Además, la actividad funcional de los análogos de péptidos GLP-1 puede demostrarse examinando las propiedades insulínicas de los análogos de hormonas peptídicas. La actividad insulínica puede determinarse, por ejemplo, proporcionando un análogo de un péptido dado a células animales, o inyectando ese análogo en animales y supervisando la liberación de insulina inmunoreactiva (IRI) en el medio o en el sistema circulatorio del animal, respectivamente. La presencia de IRI puede detectarse a través del uso de un radioinmunoanálisis que puede detectar específicamente insulina.

[0097] El ratón db/db es una especie de ratón genéticamente obeso y diabético. El ratón db/db desarrolla hiperglucemia e hiperinsulinemia concomitante con su desarrollo de la obesidad y, de este modo, sirve como modelo de diabetes de tipo 2 con obesidad (NIDDM). El ratón db/db puede comprarse en The Jackson Laboratories (Bar Harbour, Me.), por ejemplo. En un modo de realización ejemplar, para el tratamiento del ratón con un régimen que incluye un análogo de hormona peptídica o control, las muestras de sangre del seno suborbital se toman antes y en determinados momentos (p.ej., 60 minutos) tras la administración de la dosis de cada animal. Las mediciones de glucosa en sangre pueden realizarse mediante cualquiera de las diversas técnicas convencionales, como utilizando un medidor de glucosa. Se comparan los niveles de glucosa en sangre de los animales de control y de los administrados el análogo de hormona peptídica.

[0098] La evolución metabólica del análogo de GLP-1 exógeno puede seguirse también en sujetos no diabéticos o diabéticos de tipo II, y determinar el efecto de un análogo candidato. Por ejemplo, se puede usar una combinación de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), radioinmunoanálisis específicos (RIAs), y la prueba de inmunoabsorción relacionada con las enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), en la que se puede detectar GLP-1 biológicamente activo intacto y sus metabolitos. Véase, por ejemplo, Deacon et al. (1995) Diabetes 44:1126-1131. A modo ilustrativo, después de la administración de un análogo de GLP-1, el péptido intacto puede medirse utilizando RIA o ELISA dirigido al NH₂-terminal, mientras que la diferencia en la concentración entre estos ensayos y un radioinmunoanálisis específico del CO₂H-terminal permite la determinación de los metabolitos truncados en el NH₂-terminal. Sin el análogo, el GLP-1 subcutáneo se degrada rápidamente de forma dependiente del tiempo, formando un metabolito que coeluye en HPLC con GLP-1(9-36)amida y

tiene el mismo perfil inmunorreactivo. Por ejemplo, pasados treinta minutos tras la administración de GLP-1 subcutánea a pacientes diabéticos (n es 8), el metabolito representaba el 88,5 +1,9% del aumento en la inmunorreactividad en plasma determinada mediante radioinmunoanálisis específico del CO₂-terminal, que fue más
5 alto que los niveles medidos en sujetos sanos (78,4 +3,2%; n= 8; P <0,05). Véase Deacon et al. , arriba. El GLP-1 infundido de forma intravenosa también se degradó en gran medida.

[0099] Se describen otros métodos de medición de la actividad insulínica de los análogos de GLP-1 en la patente estadounidense 5.545.618.

10 (d) *Preparados farmacéuticos*

[0100] Para uso terapéutico, el análogo de GLP-1 elegido se formula con un portador que es farmacéuticamente aceptable y apropiado para la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de GLP-1 a un sujeto utilizando una dosis adaptada para la vía de administración seleccionada, es decir, oral, intravenosa,
15 o parenteral, para hacer llegar el péptido al tejido deseado. En determinados modos de realización, los análogos son no pirogénicos, es decir, no provocan un aumento de la temperatura del cuerpo del paciente superior a la cantidad clínicamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados son aquellos que se utilizan de manera convencional en medicamentos basados en péptidos, como diluyentes, excipientes y similares. Se puede hacer referencia a "Remington's Pharmaceutical
20 Sciences", 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, para una orientación sobre formulaciones de medicamentos en general. En un modo de realización de la invención, los compuestos se formulan para la administración mediante infusión, p.ej., cuando se utilizan como suplementos nutricionales líquidos para pacientes en terapia nutricional parenteral total, o mediante inyección, p.ej., de
25 forma subcutánea, intramuscular o intravenosa, y en consecuencia, se utilizan como soluciones acuosas en su forma estéril y libre de pirógeno, y opcionalmente tamponadas a un pH fisiológicamente aceptable, p.ej., un pH ligeramente ácido o fisiológico. De ese modo, los compuestos pueden administrarse en un vehículo como
30 agua destilada o, más preferentemente, en solución salina, solución salina tampón fosfato o solución de dextrosa al 5%. La solubilidad en agua del análogo de GLP-1 puede mejorarse, si se desea, mediante la incorporación de un potenciador de la solubilidad, como ácido acético o hidróxido de sodio.

[0101] Los análogos de GLP-1 de esta invención pueden proporcionarse en forma de
35 sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen, sin carácter limitativo, aquellas formadas con ácidos orgánicos (p.ej., ácido acético, láctico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, metanosulfónico, o

toluensulfónico), y ácidos inorgánicos (p.ej., ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico), y ácidos poliméricos (p.ej., ácido tánico, carboximetil celulosa, poliláctico, poliglicólico, o copolímeros de ácido poliláctico-glicólico).

[0102] Una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de GLP-1 de esta invención y una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable (p.ej., carbonato de magnesio, lactosa, o un fosfolípido con el que el análogo terapéutico pueda formar una micela) forman juntos una composición terapéutica (p.ej., una pastilla, comprimido, cápsula o líquido) para su administración (p.ej., por vía oral, intravenosa, transdérmica, pulmonar, vaginal, subcutánea, nasal, iontoforética, intratraqueal, intracraneal, intramiocárdica, intrapericárdica, intramuscular) a un sujeto. La pastilla, comprimido, o cápsula que se va a administrar oralmente puede recubrirse con una sustancia para proteger la composición activa del ácido gástrico o las enzimas intestinales en el estómago durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que pase sin digerir al intestino delgado. La composición terapéutica también puede encontrarse en forma de formulación de liberación sostenida biodegradable o no biodegradable para administración subcutánea o intramuscular. Véase, p.ej., las patentes estadounidenses nº 3.773.919 y 4.767.628 y la solicitud de PCT nº WO 94/15587. También se puede lograr una administración continua utilizando una bomba implantable o externa (p.ej., la bomba INFUSAID™). La administración también puede llevarse a cabo de forma intermitente, p.ej., una sola inyección diaria, o continuamente en una dosis pequeña, p.ej., formulación de liberación sostenida.

[0103] Las composiciones terapéuticas o de diagnóstico de la invención se administran a un sujeto en cantidades suficientes para tratar o diagnosticar trastornos. La dosis efectiva de un péptido de la presente invención para tratar las enfermedades o afecciones arriba mencionadas varían dependiendo de la manera de administración, la edad y el peso corporal del sujeto, y el estado de salud del sujeto que se va a tratar, y en última instancia se decidirá por el médico o veterinario que lo atiende.

[0104] También se contempla en el ámbito de la presente invención un péptido cubierto por la fórmula genérica anterior para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas al metabolismo aberrante de la glucosa, metabolismo de los lípidos o trastorno alimentario.

[0105] Serán evidentes otras características y ventajas de la presente invención a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones.

(v) Métodos de uso

(1) Usos de diagnóstico

[0106] Los análogos de GLP-1 de la invención pueden utilizarse en su forma radiomarcada o no marcada para diagnosticar o tratar una variedad de enfermedades

incluyendo, sin carácter limitativo, aquellas asociadas con el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, la ingesta de alimento, y la hipertensión.

[0107] Preferentemente, los complejos radiomarcados de los compuestos de la invención se utilizan para tales diagnósticos y tratamientos. Los modos de realización radiomarcados de los compuestos de la invención pueden usarse en la cirugía guiada por radioisótopos, como se describe en el texto WO 93/18797 y en Woltering, et al. (1994) Surgery 116, 1139-1147. En un modo de realización preferido, un complejo de un radionucleótido emisor de radiación gamma, como ^{99}Tc , y un compuesto de la invención se usa para diagnosticar un tumor que expresa los receptores de la somatostatina (SSTR), y posteriormente, se utiliza un complejo de radionucleótido emisor de radiación β como ^{188}Re o ^{186}Re con el compuesto para tratar el tumor.

[0108] Para fines de diagnóstico, se administra una cantidad de diagnóstico efectiva del agente de diagnóstico o radiodiagnóstico de la invención, preferentemente por vía intravenosa. Una cantidad de diagnóstico efectiva se define como la cantidad de agente de diagnóstico o radiodiagnóstico necesaria para llevar a cabo la localización y detección del marcador *in vivo* utilizando metodologías convencionales como la resonancia magnética, tomografía computerizada, gammagrafía, SPECT, PET, y similares.

[0109] Para el diagnóstico que utiliza imágenes gammagráficas, preferentemente, se administran los compuestos de la invención marcados con ^{99}Tc en una sola dosis unitaria inyectable. Los compuestos marcados con ^{99}Tc proporcionados por la invención pueden administrarse de manera intravenosa en cualquier medio convencional para la inyección intravenosa, como un fluido de solución salina acuosa, o un fluido en el plasma sanguíneo. Generalmente, la dosis unitaria que se debe administrar tiene una radioactividad de aproximadamente 0,01 mCi a aproximadamente 100 mCi, preferiblemente de 1 mCi a 50 mCi. La solución a inyectar en dosis unitaria es de aproximadamente 0,01 mL a aproximadamente 10 mL. Tras la administración intravenosa, se pueden producir las imágenes *in vivo* en cuestión de unos minutos. Sin embargo, las imágenes pueden producirse, si se desea, horas o incluso más tiempo después de que el compuesto radiomarcado se inyecte a un paciente. En la mayoría de los casos, una cantidad suficiente de la dosis administrada se acumulará en el área a visualizar en el plazo de aproximadamente 0,1 de una hora para permitir tomar fotos de la gammagrafía. Se puede utilizar cualquier método convencional de imágenes gammagráficas para fines de diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

(2) Usos en tratamiento

[0110] Los análogos de GLP-1 pueden utilizarse para tratar cualquier enfermedad o problema que pueda ser tratado con una composición terapéutica de un polipéptido dado, en la que el polipéptido se segmenta normalmente *in vivo* por la proteínasa. Dado que la proteólisis disminuye o elimina la capacidad del producto terapéutico, y en algunos casos lleva a la producción de productos funcionalmente antagonistas, la seguridad y eficacia de muchos productos terapéuticos de polipéptidos que pueden usarse para tratar una enfermedad o afección específica queda comprometida en gran medida. Por tanto, los usos y composiciones de análogos de GLP-1 resistentes a la proteínasa proporcionan usos mejorados de tratamiento de un gran número de diversas enfermedades y afecciones.

[0111] Para ilustrar de una manera más explícita la aplicabilidad de los análogos de GLP-1 en métodos mejorados de tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones, proporcionamos los siguientes ejemplos no limitativos: la capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre, mitigar la obesidad, aliviar los trastornos de la tolerancia a la glucosa, inhibir la neogénesis de glucosa hepática, y reducir los niveles de lípidos en sangre e inhibir la aldosa reductasa. De ese modo, son útiles para la prevención y/o terapia de la insuficiencia cardíaca congestiva, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia, complicaciones diabéticas (incluyendo retinopatía, nefropatía, neuropatía, cataratas, enfermedad de las arterias coronarias y arterioesclerosis) y además para la hipertensión y osteoporosis relacionadas con la obesidad.

[0112] En determinados modos de realización, los análogos resistentes a la proteólisis para su uso según la invención comprenden análogos de GLP-1 de péptidos GLP-1 activos. Se sabe que los péptidos GLP-1 de diversas longitudes son activos biológicamente incluyendo: GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), y GLP-1(7-37) cuyas secuencias se exponen a continuación:

GLP-1(7-37): HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGRG;

GLP-1 (7-36): HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGR(-NH₂);

GLP-1 (7-35): HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFIAWLVK; y

GLP-1 (7-34): HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFIAWLV.

[0113] En determinados modos de realización, la presente invención está relacionada con un uso para modificar el metabolismo de la glucosa. Los análogos de GLP-1 de péptidos GLP-1 pueden administrarse a pacientes que sufren diabetes mellitus. La diabetes mellitus es una enfermedad que se caracteriza por la hiperglucemia que se produce por una disminución absoluta o relativa de la secreción de insulina, la sensibilidad disminuida a la insulina, o resistencia a la insulina. La morbosidad y mortalidad de esta enfermedad se produce por complicaciones vasculares, renales y

neurológicas. La prueba clínica para diagnosticar la diabetes es la prueba de tolerancia a la glucosa oral. En una prueba de tolerancia a la glucosa oral, se evalúa la respuesta fisiológica del paciente a una carga de glucosa o una exposición. Tras la ingesta de glucosa, se evalúa la respuesta fisiológica del paciente a la exposición a la glucosa. Generalmente, esto se logra determinando los niveles de glucosa en sangre del paciente (la concentración de glucosa en el plasma, suero, o la sangre completa del paciente) en determinados momentos en el tiempo.

[0114] Así, en un aspecto, la presente invención hace referencia a productos terapéuticos y los usos relacionados de análogos de GLP-1 resistentes a la proteólisis para tratar enfermedades relacionadas con el corazón, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia, complicaciones diabéticas (incluyendo la retinopatía, nefropatía, neuropatía, cataratas, enfermedad de las arterias coronarias y arterioesclerosis) y además para la hipertensión y osteoporosis relacionada con la obesidad.

[0115] En determinados modos de realización, los análogos de GLP-1 de interés pueden usarse como parte de tratamientos de diversas enfermedades relacionadas con el corazón. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con el corazón incluyen el infarto de miocardio, lesiones de isquemia-reperfusión, insuficiencia cardiaca congestiva, y paro cardíaco. Los análogos de GLP-1 pueden usarse también en la prevención de enfermedades relacionadas con el corazón.

[0116] En determinados modos de realización, los análogos en cuestión pueden usarse para inducir la estimulación del tratamiento o mejora de la depresión, trastorno esquizoafectivo, apnea del sueño, síndromes del déficit de atención con problemas de concentración, pérdida de memoria, olvido, y narcolepsia.

[0117] La invención contempla el uso de análogos de GLP-1 en tratamientos en los que el régimen terapéutico está constituido solamente por el análogo de GLP-1, así como en los tratamientos en los que se usa la administración de uno o más análogos de GLP-1 como parte de un régimen terapéutico multifactorial complejo. Por ejemplo, en caso de tratar la diabetes y/o las complicaciones de la diabetes, la presente invención contempla tratar la diabetes mediante la administración de un análogo de GLP-1. La presente invención también contempla que, en algunas circunstancias, puede resultar preferible administrar más de un análogo de GLP-1. Por ejemplo, el método de tratamiento puede comprender la administración de dos o más análogos de GLP-1. Tales análogos de GLP-1 pueden ser análogos del mismo polipéptido (p.ej., dos análogos de GLP-1 diferentes). Además, la invención contempla que la administración de uno o más análogos de GLP-1 puede usarse como parte de un régimen terapéutico complejo. En el caso de un método de tratamiento de la diabetes o complicaciones de la diabetes, un régimen terapéutico ejemplar puede incluir la

administración de uno o más análogos de GLP-1, la administración de insulina, modulación de la dieta y modulación del ejercicio.

[0118] En otro ejemplo más de un régimen terapéutico de múltiples facetas, la invención contempla la administración de uno o más análogos de GLP-1 y uno o más agentes que inhiben la actividad enzimática de la enzima concreta que rompe la proteína nativa de forma endógena. En el caso de GLP-1, un método ejemplar comprendería la administración de uno o más análogos de péptidos con uno o más inhibidores de DPP IV. Los inhibidores de una enzima concreta pueden ser específicos (p.ej., un inhibidor que modula únicamente la actividad de la DPP IV) o el inhibidor puede ser más promiscuo (p.ej., un inhibidor que modula la actividad de múltiples serina proteasas). Además, la invención contempla la administración de uno o más análogos de GLP-1 y una o más enzimas que degradan la enzima particular que rompe la proteína nativa de forma endógena. En el caso del GLP-1, un método ejemplar comprendería la administración de uno o más análogos de péptidos con una o más enzimas que degradan la DPP IV. Tales enzimas pueden ser específicas (p.ej., una enzima que solo degrada la DPP IV) o la enzima puede degradar otras múltiples proteínas (p.ej., una enzima que degrada diversas serina proteasas).

(f) Métodos comerciales

[0119] Otra área de la invención proporciona determinados métodos para hacer negocios. En particular, llevar a cabo los métodos de la invención puede identificar determinados análogos de GLP-1 resistentes a peptidasa. Esta fase técnica, cuando se combina con una o más fases adicionales, proporciona planteamientos novedosos para llevar a cabo negocios farmacéuticos, agroquímicos, biotecnológicos, o preferiblemente de ciencias de la vida. Por ejemplo, los análogos de GLP-1 según la presente invención pueden entonces someterse a ensayos para la eficacia como productos terapéuticos en una variedad de modelos de enfermedades, y las composiciones terapéuticas potenciales pueden someterse a ensayo entonces para su toxicidad u otros perfiles de seguridad antes de formular, envasar y posteriormente comercializar la formulación resultante para el tratamiento de la enfermedad. Alternativamente, los derechos de desarrollar y comercializar tales formulaciones o de llevar a cabo tales fases pueden concederse a terceros mediante licencia onerosa. En determinados aspectos diferentes de la invención, los análogos de GLP-1 identificados como tales puede tener utilidad como información que puede proporcionarse a un tercero a cambio de contraprestación de manera que se pueda obtener una mayor comprensión de la función o efectos secundarios en un contexto biológico o terapéutico.

[0120] En determinados modos de realización, el análogo de GLP-1 identificado inicialmente puede someterse a una mayor optimización, p.ej., para refinar en mayor medida la estructura de un análogo inicial. Dicha optimización puede llevar al desarrollo de análogos que combinen una resistencia máxima a la proteólisis y unas características farmacéuticamente deseables: solubilidad, permeabilidad, biodisponibilidad, toxicidad, mutagenicidad, y farmacocinética.

[0121] Se realizan modificaciones estructurales en el análogo inicial para lograr tejidos con los parámetros enumerados arriba. Sin embargo, estas modificaciones deben tener en cuenta los posibles efectos en la potencia y actividad del análogo. Por ejemplo, si la toxicidad de un análogo inicial es alta cuando se prueba en un modelo animal, pueden realizarse modificaciones al análogo en un esfuerzo por disminuir la toxicidad mientras que se mantiene la característica deseada de resistencia a la proteinasa.

[0122] Los análogos candidatos (tanto si dichos análogos se modifican para alterar o mejorar las características *in vivo* como si no) o las combinaciones del mismo, deben someterse a pruebas para eficacia y toxicidad en modelos animales. Tal elaboración de perfiles terapéuticos se utiliza comúnmente en la técnica farmacéutica. Antes de probar un producto terapéutico experimental en humanos, debe completarse el establecimiento de un perfil terapéutico exhaustivo (pruebas pre-clínicas) para delimitar los parámetros iniciales de seguridad y eficacia. Las pruebas pre-clínicas establecen un mecanismo de acción para el producto terapéutico, su biodisponibilidad, absorción, distribución, metabolismo, y eliminación a través de los estudios realizados *in vitro* (es decir, en tubos de ensayo, vasos de precipitado, placas de Petri, etc.) y en animales. Los estudios en animales se utilizan para evaluar si el producto terapéutico proporcionará los resultados deseados. Se administran diferentes dosis del producto terapéutico experimental para probar la eficacia del mismo, identificar efectos secundarios perjudiciales que podrían ocurrir, y evaluar la toxicidad.

[0123] En resumen, una persona con experiencia en la técnica reconocerá que la identificación de un análogo resistente a la proteinasa candidato es un primer paso para desarrollar una preparación farmacéutica útil para su administración. La administración de una cantidad de una preparación farmacéutica que comprende dicho análogo P₁ eficaz para tratar una afección o enfermedad debe ser tanto seguro, como efectivo. Los ensayos de medicamentos de fase temprana, usados de forma rutinaria en la técnica, ayudan a resolver los problemas de seguridad y eficacia de un producto farmacéutico potencial. En el caso específico de un análogo P₁, la eficacia de la preparación farmacéutica puede evaluarse fácilmente primero en un cultivo celular, y después en un ratón o rata modelo. Los sistemas de cultivos celulares y modelos

animales adecuados para la indicación de la enfermedad específica para la que un análogo P₁ dado se va a usar pueden ser seleccionados de manera sencilla por una persona con experiencia en la técnica. En síntesis, se puede administrar a ratones o ratas diferentes dosis de dichas preparaciones farmacéuticas durante diversos momentos programados. La vía de administración se elegiría de manera apropiada basándose en las características particulares del agente y en el tipo de célula a los que se desea hacer llegar el análogo P₁. Se puede administrar un placebo (p.ej., solo portador o excipiente) a los ratones de control.

[0124] En un modo de realización, la fase de establecer el perfil del producto terapéutico incluye pruebas de toxicidad de los análogos en cultivos celulares y en animales; análisis de la farmacocinética y metabolismo del análogo candidato; y determinación de la eficacia en modelos animales de las enfermedades. En determinados casos, el método puede incluir analizar la relación entre la estructura y la actividad y optimizar los análogos iniciales basándose en los perfiles de eficacia, seguridad y farmacocinética. El objetivo de tales pasos es la selección de candidatos de análogos para estudios pre-clínicos que lleven a la presentación de solicitudes de nuevo fármaco en investigación (Investigational New Drug, "IND") ante el Food and Drug Administration (FDA) antes de los ensayos clínicos en seres humanos.

[0125] Entre la optimización del inicial y el establecimiento del perfil terapéutico, un objetivo es desarrollar un análogo P₁ que sea resistente a una proteasa específica y pueda administrarse con unos efectos secundarios mínimos. En el caso de análogos para uso *in vitro*, los análogos ejemplares no deben ser excepcionalmente tóxicos para las células en el cultivo, no deben ser mutagénicos para las células en el cultivo, y no deben ser carcinogénicos para las células en el cultivo. En el caso de análogos para uso *in vivo*, los análogos ejemplares no deben ser excepcionalmente tóxicos (p.ej., solo deben tener efectos secundarios tolerables cuando se administren a los pacientes), no deben ser mutagénicos, y no deben ser carcinogénicos.

[0126] Con el establecimiento del perfil de toxicidad se hace referencia a la evaluación de los efectos secundarios perjudiciales potenciales que pueden ocurrir cuando se administra una cantidad eficaz de una preparación farmacéutica. Un efecto secundario puede o no ser perjudicial, y la determinación de si el efecto secundario asociado con una preparación farmacéutica es un efecto secundario aceptable la realiza la Food and Drug Administration durante el proceso de aprobación reglamentario. Esta determinación no sigue unas reglas inmutables, y lo que se considera un efecto secundario aceptable varía debido a factores que incluyen: (a) la gravedad de la afección que se está tratando, y (b) la disponibilidad de otros tratamientos y los efectos secundarios actualmente asociados a estos tratamientos

disponibles. Por ejemplo, el término cáncer abarca una familia compleja de estados patológicos relacionados con un crecimiento, proliferación y diferenciación celular mal regulados. Numerosas formas del cáncer son enfermedades especialmente devastadoras que provocan dolores agudos, pérdida de función del tejido afectado, y la muerte. Los medicamentos quimioterapéuticos constituyen una parte importante de la terapia estándar de muchas formas de cáncer. Aunque los propios productos quimioterapéuticos pueden tener efectos secundarios graves como la pérdida del pelo, fuertes náuseas, pérdida de peso, y esterilidad, dichos efectos secundarios se consideran aceptables dada la gravedad de la enfermedad que tratan de curar. En el contexto de la presente invención, que un efecto secundario se considere significativo dependerá de la afección a tratar y la disponibilidad de otros métodos para tratar esa afección.

[0127] Las pruebas de toxicidad pueden realizarse junto con las pruebas de eficacia, y se puede monitorizar a los ratones a los que se ha administrado una dosis efectiva de la preparación farmacéutica para observar las posibles reacciones adversas a la preparación.

[0128] Uno o más análogos P₁ resistentes a la proteinasa, que se haya demostrado que son seguros y eficaces en los estudios en animales, pueden formularse en una preparación farmacéutica. Tales preparaciones farmacéuticas pueden entonces ser comercializadas, distribuidas y vendidas. Los análogos P₁ ejemplares y las preparaciones farmacéuticas de dichos análogos pueden comercializarse y venderse solos, o pueden venderse como paquetes y/o kits farmacéuticos. Además, en cualquiera de los aspectos anteriores, un método de desarrollar un negocio basado en el diseño de uno o más análogos P₁ puede incluir opcionalmente un sistema para facturar al paciente y/o al seguro del paciente, así como un sistema para obtener el reembolso adecuado del paciente y/o del seguro del paciente.

Ejemplos

[0129] Los siguientes ejemplos se muestran con carácter ilustrativo y no con carácter limitativo.

Ejemplo 1: Análogos de GLP-1 resistentes a la proteinasa

[0130] La administración de GLP-1 es un producto terapéutico candidato para la diabetes. Sin embargo, una de las barreras para la eficacia de un tratamiento basado en la administración de GLP-1 es la rápida degradación *in vivo* del GLP-1 por la DPP IV. La DPP IV escinde el GLP-1 cerca del N-terminal entre la alanina y el ácido glutámico, y estudios previos han indicado que esta escisión se produce de forma extremadamente rápida tras la administración de GLP-1 exógeno (Figura 1).

[0131] Para generar análogos peptídicos resistentes a la proteólisis, construimos análogos que contenían tetra-sustituciones en la posición P'1 del GLP-1. En los siguientes ejemplos, se utilizó GLP-1(7-37). En resumen, realizamos sustituciones del ácido glutámico en P'1 del GLP-1. Dos sustituciones específicas que se realizaron y se probaron fueron 3-dimetil-aspartato y 3-butil-metil-glicina. Los análogos de GLP-1 resultantes se denominaron GLP-1 (3DMA) (en el que la sustitución de P'1 era 3-dimetil-aspartato) y GLP-1 (BM) (en el que la sustitución de P'1 era 3-butil-metil-glicina).

[0132] La Figura 2 resume los experimentos que demostraron que ambos el GLP-1 (3DMA) y el GLP-1 (BM) eran resistentes a la ruptura mediante DPP IV en comparación con el GLP-1 nativo. Sin embargo, es más deseable producir análogos de péptidos que sean no solo resistentes a la proteólisis, sino que también conserven toda o la mayor parte de la actividad biológica del péptido nativo. Por consiguiente, realizamos una serie de experimentos para asegurar que estos análogos de GLP-1 que manifestaban una magnífica resistencia a la degradación por DPP IV, conservaban también las actividades biológicas del GLP-1 nativo.

Ejemplo 2: Los análogos de GLP-1 resistentes a la proteinasa conservan la actividad funcional del GLP-1 nativo

[0133] Realizamos una serie de experimentos para evaluar la actividad funcional de ambos el GLP-1 (3DMA) y el GLP-1 (BM) en comparación con el péptido GLP-1 nativo. Las Figuras 3-4 resumen los resultados de estos experimentos. En síntesis, examinamos dos propiedades funcionales del GLP-1: la unión del GLP-1 a su receptor y la transducción de señal en un ensayo mediante la producción de AMPc. La Figura 3 resume los experimentos que examinaron la actividad del GLP-1 (3DMA). El panel izquierdo compara la cinética de unión al receptor. Observamos que el GLP-1 (3DMA) conserva la capacidad de unirse al receptor de GLP-1. Además, observamos que la unión era similar, aunque no idéntica, a la del péptido nativo.

[0134] En el lado derecho del panel se proporcionan otros análisis que resumen un ensayo para asegurar si el GLP-1 (3DMA) potencia una señalización de GLP-1 de forma similar al péptido nativo. Se transfectaron de manera transitoria células COS-7 (aproximadamente 10^6 /placa de 10 cm) con ADNc que codifica el receptor de GLP-1 humano. Un día después de la transfección, las células fueron triptinizadas y sembradas en placas de 24 pocillos (densidad de aproximadamente 10^5 / pocillo). Dos días tras la transfección, las células fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con GLP-1 nativo (0,3 μ M), GLP-1 (3DMA) (10 μ m), o en ausencia de ambos péptidos. El contenido de AMPc, que guarda correlación con la señalización mediada por el receptor, se midió en el lisado celular mediante radioinmunoanálisis de centelleo

por proximidad. Como se muestra en la Figura 3, el GLP-1 (3DMA) potenció la señalización a través del receptor de GLP-1 en un grado indistinguible del GLP-1 nativo.

5 [0135] La Figura 4 resume experimentos similares en los que se midió la actividad del GLP-1(BM). En resumen, las células COS-7 (aprox. 10^6 /placa de 10 cm) fueron transfectadas de manera transitoria con ADNc que codifica el receptor de GLP-1 humano. Un día después de la transfección, las células se tripsinizaron y sembraron en placas de 24 pocillos (densidad de aproximadamente 10^5 /pocillo). Dos días después de la transfección, se incubaron las células durante una hora a temperatura ambiente con GLP-1 nativo (0,3 μ M), GLP-1 (BM) (10 μ M), o en ausencia de cualquier péptido. El contenido de AMPc, que guarda correlación con la señalización mediada por el receptor, se midió en el lisado celular mediante radioinmunoanálisis de centelleo por proximidad. Como se muestra en la Figura 4, el GLP-1 (BM) potenció la señalización a través del receptor de GLP-1 en un grado indistinguible del GLP-1 nativo.

15 Ejemplo 3: Los análogos de GLP-1 sustituido con terc-leucina son resistentes a la degradación por DPP IV

[0136] Los datos proporcionados en los ejemplos 1 y 2 demostraron que dos sustituciones distintas en la posición P₁' de GLP-1 produjeron análogos de péptidos resistentes a la proteinasa. También hemos demostrado que una tercera sustitución en la posición P₁' también produce un análogo de péptido resistente a la proteinasa. En resumen, el ácido glutámico en P₁' del GLP-1 (7-37) fue sustituido con leucina terciaria (TLE), y se evaluó la capacidad de la DPP IV de escindir este análogo de péptido.

25 [0137] La Figura 5 muestra el análisis de HPLC/MS del GLP-1 (7-37) tras dos horas de tratamiento con DPP IV humana (cromatograma inferior) en comparación con el GLP-1 (7-37) en ausencia de proteinasa (cromatograma superior). Como se esperaba, el tratamiento con DPP IV tuvo como resultado la degradación dependiente del tiempo del GLP-1.

30 [0138] La Figura 6 muestra el análisis de HPLC/MS de un análogo de GLP-1 (7-37) modificado por terc-leucina. El análogo de GLP-1 modificado por terc-leucina fue tratado con DPP IV humana durante dos horas, y se comparó la degradación del análogo con el paso del tiempo con la del análogo en ausencia de DPP IV. La comparación de los cromatogramas (observación: el panel superior corresponde al análogo de péptido no tratado y el panel inferior corresponde al análogo de péptido tratado) demostró que el GLP-1 modificado por terc-leucina es resistente a la degradación por DPP IV.

Ejemplo 4: La sustitución de la posición P'1 confiere resistencia a otras proteinasas

5 **[0139]** Los ejemplos anteriores proporcionan numerosas pruebas que demuestran que una variedad de sustituciones en la posición P'1 confieren resistencia a la degradación por la serina proteasa DPP IV. Sin embargo, este método de tetra-sustitución en la posición P'1 para conferir resistencia a la proteinasa no es específico de los sustratos escindidos por DPP IV. También hemos demostrado que la tetra-sustitución en la posición P'1 de un sustrato modelo confiere resistencia a la rotura por trombina. 10 Aunque la trombina es una serina proteinasa, reconoce un lugar de escisión diferente del de la DPP IV, y los resultados aquí resumidos indican la amplia aplicabilidad de los métodos de la presente invención para fabricar análogos P'₁ resistentes a la degradación por una variedad de proteinasas.

15 **[0140]** La Figura 7 resume los experimentos que demuestran que la sustitución de una leucina terciaria (TLE) en la posición P'₁ de un sustrato de trombina modelo confirió resistencia a la proteólisis. En síntesis, el péptido WALAPRSFA es un sustrato modelo para la trombina. La trombina escinde después del residuo de arginina. Del mismo modo, el residuo de serina de este péptido modelo es la posición P'1.

WALAPR ↓SFA

20

[0141] En el esquema de arriba, el residuo de serina de la posición P'1 se indica en negrita y la flecha indica el lugar de escisión por trombina después del residuo de arginina.

25 **[0142]** Para probar la capacidad de la tetra-sustitución en la posición P'1 de conferir resistencia a la proteólisis de trombina, preparamos un péptido modelo en el que la posición P'1 contenía una leucina terciaria (TLE). El análogo de péptido modelo se representa a continuación, en el que se utiliza una X para indicar la sustitución de leucina terciaria.

WALAPRXFA

30

[0143] Para comparar la digestión del análogo de péptido modelo por la trombina con la del péptido modelo nativo, los péptidos fueron digeridos durante 4 horas a 23 °C con 10nM de trombina en 0,1 M de HEPES pH 8, 0,14 M NaCl, 5mM CaCl₂, 0,5% PEG6000. Tras la digestión, la HPLC en fase reversa C18 de los digeridos se comparó 35 con los péptidos no digeridos, y los espectros de masas de los picos principales se muestran para cada cromatograma en la Figura 7. Como se muestra en la Figura 7, el péptido no modificado fue escindido por la trombina eficientemente para dar un

producto de escisión WALAPR. En cambio, al análogo de péptido sustituido con leucina terciaria no fue escindido por la trombina en estas condiciones.

Ejemplo 5: Resultados *in vivo* para análogos de GLP-1 de dimetil aspartato estables

5 [0144] La Figura 8 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para Exendin-4 con el tiempo para tres dosis diferentes (40µg, 4µg, y 0,4µg) en comparación con una solución de control salina.

[0145] La Figura 9 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis de 40 µg con el paso del tiempo comparado con el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para una
10 solución salina o un control de GLP-1.

[0146] La Figura 10 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) para tres dosis diferentes (800 µg, 80 µg, y 8 µg) con el paso del tiempo comparado con un control de solución salina.

15 [0147] El análogo de GLP-1 TPA1B4 es un análogo de los residuos 7-36 del GLP-1 con una amida C-terminal y un residuo de β-dimetil-aspartato en la posición 9. La secuencia para TPA1B4 es:

HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR-NH₂

[0148] Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* utilizando ratones hembra BKS.Cg-m+/-LePr(db)/J que se compraron a las 5-7 semanas de edad y se les dejó ajustarse a las condiciones del vivero durante dos semanas antes de empezar los experimentos. Los ratones fueron alojados en jaulas ventiladas individualmente y presurizadas. Se utilizó una dieta de roedor estándar proporcionando comida y agua *ad libitum*. Se midió la glucosa en sangre con un monitor de glucosa en sangre ThereaSense
25 Freestyle. Se hizo un corte en la vena de la cola con una aguja para obtener una pequeña gota de sangre (aproximadamente 10 µL) para cada medición. Se disolvió el análogo de GLP-1 (TPA1B4) y exendin-4 en solución salina tampón fosfato (PBS) administrado mediante inyección intraperitoneal de la dosis indicada en 0,2 mL. El control de solución salina para este experimento fue una inyección de 0,2 mL de
30 solución salina tampón fosfato. Se tomaron mediciones de glucosa en sangre en t= 0, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h (y 6 h). Los valores en las Figuras 8 y 9 son la media de los cinco ratones.

[0149] La Figura 11 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis de 20 mg/kg con el
35 paso del tiempo comparado con el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para un control de solución salina o un control de GLP.

[0150] La Figura 12 muestra el nivel de glucosa en sangre en ratones diabéticos para un análogo de GLP-1 (TPA1B4) con una dosis 20 mg/kg con el paso del tiempo comparado con el nivel de glucosa en sangre para un control de solución salina o control de GLP-1.

5 **[0151]** Los ratones hembra BKS.Cg-m+/-LePr(db)/J se compraron a las 5-7 semanas de edad y se les dejó ajustarse a las condiciones del vivero durante dos semanas antes de empezar los experimentos. Se alojaron los ratones en jaulas ventiladas individualmente y presurizadas. Se utilizó una dieta de roedor estándar proporcionando comida y agua *ad libitum*. Se midió la glucosa en sangre con un
10 monitor de glucosa en sangre TheraSense Freestyle. Se hizo un corte en la vena de la cola con una aguja para obtener una pequeña gota de sangre (aproximadamente 10 μ L) para cada medición. Se sometió a los ratones a ayuno durante las dos horas antes de la administración de la dosis y a lo largo del experimento. Se disolvió el análogo de GLP-1 (TPA1B4) y GLP-1 en solución salina tampón fosfato (PBS) y se administró
15 mediante inyección intraperitoneal de la dosis indicada en 0,4 mL. El control de solución salina para este experimento era una inyección de 0,4 mL de solución salina tampón fosfato. Se tomaron medidas de glucosa en sangre en t= 0, 30min, 1h, y 4h. Los valores señalados son la media de diez ratones.

[0152] La Figura 13 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para
20 Exendin-4 con el paso del tiempo para tres dosis diferentes (8 μ g, 0,8 μ g, y 0,08 μ g) en comparación con un control de solución salina.

[0153] La Figura 14 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para GLP-1 con el paso del tiempo para una dosis de 800 μ g en comparación con un control de solución salina.

25 **[0154]** La Figura 15 muestra el cambio de porcentaje de glucosa en sangre para un análogo de GLP-1 (P1732) para dos dosis diferentes (8 μ g y 0,8 μ g) en comparación con un control de solución salina.

[0155] El análogo de GLP-1 P1732 es un análogo de los residuos de GLP-1 7-36 que incorpora una parte de la cola de Exendin-4 con una amida C-terminal y un residuo de
30 β -dimetil-aspartato en la posición 9. La secuencia para P1732 es:
HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH2

[0156] Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* utilizando ratones hembra BKS.Cg-m+/-LePr(db)/J que se compraron a las 5-7 semanas de edad y se les dejó ajustarse
35 a las condiciones del vivero durante dos semanas antes de empezar los experimentos. Los ratones fueron alojados en jaulas ventiladas individualmente y presurizadas. Se

utilizó una dieta de roedor estándar proporcionando comida y agua *ad libitum*. Se midió la glucosa en sangre con un monitor de glucosa en sangre TheraSense Freestyle. Se hizo un corte en la vena de la cola con una aguja para obtener una pequeña gota de sangre (aproximadamente 10 μ L) para cada medición. Se sometió a los ratones a ayuno durante las dos horas anteriores a la administración de la dosis y a lo largo del experimento. Se disolvió el análogo de GLP-1 (P1732) en solución salina tampón fosfato (PBS) y se administró mediante inyección intraperitoneal de la dosis indicada en 0,4 mL. El control de solución salina para este experimento fue una inyección de 0,4 mL de solución salina tampón fosfato. Se tomaron mediciones de glucosa en sangre antes de la inyección y los 30, 60 y 240 minutos de la inyección. Los valores señalados son la media de 5 ratones para datos de P 1732 y 10 ratones para el control de solución salina.

[0157] La Figura 16 muestra modos de realización ejemplares de la Fórmula (II), en los que los aminoácidos de origen natural han sido modificados en la posición- β (posición-3) con R_1 y R_2 , donde R_1 y R_2 son independientemente alquilo inferior o halógeno inferior. En los modos de realización preferidos, R_1 y R_2 son ambos alquilo inferior. En un modo de realización más preferido, R_1 y R_2 son independientemente metilo, etilo o propilo. En el modo de realización más preferido, ambos R_1 y R_2 son metilo.

20 *Equivalentes*

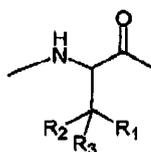
[0158] Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando únicamente experimentaciones rutinarias, numerosos equivalentes de los compuestos y métodos de uso de los mismos aquí descritos. Tales equivalentes deben considerarse incluidos en el ámbito de esta invención y quedan cubiertos por las siguientes reivindicaciones.

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteinasa, o de una variante de GLP-1, que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de sustrato de proteinasa que es escindida en condiciones fisiológicas por una proteinasa diana, en el que dicho análogo tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a dicho GLP-1 o variante de GLP-1 donde el residuo P'₁ de dicha secuencia de sustrato de proteinasa es sustituida por un análogo de aminoácido que tiene un carbono C β tetrasustituido, en el que la sustitución del residuo P'₁ reduce la susceptibilidad del análogo a la escisión por dicha proteinasa diana en relación con dicho factor peptídico o polipeptídico, y dicho análogo de aminoácido se representa mediante la fórmula II:



(II)

en la que

R₁ y R₂ son seleccionados independientemente de un alquilo C₁-C₁₀ o un halógeno;

R₃ es elegido entre alquilo C₁-C₁₀, arilo, un grupo hidroxilo, -(CH₂)_m-COOH, -(CH₂)_m-NH₂, -(CH₂)_m-N-C(=NH)NH₂, -(CH₂)_m-C(=O)NH₂, -SH, o -(CH₂)_m-S-CH₃; y m es 0, 1 ó 2;

y en la que el alquilo incluye tanto cadenas de alquilo no sustituidas, como sustituidas, que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo, estos incluyen un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (como un tioéster, un tioacetato, o un tioformato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, un ciano, un nitro, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un fragmento aromático o heteroaromático, o los fragmentos sustituidos en la cadena hidrocarburo pueden ser sustituidos ellos mismos e incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y grupos sililo, así como también éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y ésteres), -CF₃, y -CN.

2. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1 de la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 son elegidos independientemente entre un metilo, etilo o propilo.
3. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 son ambos un metilo.
4. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de la reivindicación 1, en el que R_3 es elegido entre un alquilo C_1 - C_{10} , fenilo, hidroxifenilo, indol, imidazol, hidroxilo, $-COOH$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-NC(=NH)NH_2$, $-CH_2C(=O)NH_2$, $-CH_2CH_2C(=O)NH_2$, $-SH$, o $-CH_2SCH_3$.
5. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de la reivindicación 1, que conserva al menos el 50% de la actividad biológica de dicho factor peptídico o polipeptídico activo.
6. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de la reivindicación 1, en el que la proteínasa diana es serina proteínasa, metaloproteínasa, proteínasa aspártica, o cisteína proteínasa.
7. Una preparación farmacéutica que comprende el análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Una preparación farmacéutica envasada que comprende:
el análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en un excipiente farmacéuticamente aceptable, y
una etiqueta o instrucciones para su administración a un paciente.
9. Una preparación veterinaria envasada que comprende:
el análogo resistente a la proteínasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en un excipiente aceptable, y una etiqueta o instrucciones para su administración a un animal.
10. El uso de un análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una o más entre la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, enfermedades relacionadas con el corazón, hiperglucemia, hiperinsulinemia, obesidad, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, anomalías en la mucosa del tracto digestivo, trastornos de la ingesta de alimentos, y trastorno gastrointestinal.
11. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6 para su uso en el tratamiento o prevención de una o más entre la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, enfermedades relacionadas con el corazón, hiperglucemia,

hiperinsulinemia, obesidad, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, anomalías en la mucosa del tracto digestivo, trastornos de la ingesta de alimentos, y trastorno gastrointestinal.

12. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, que además comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal de Exendin-4.

13. El análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, de la reivindicación 12, en el que la secuencia de aminoácidos C-terminal de Exendin-4 es PSSGAPPPS.

14. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteínasa, o variante de GLP-1, que tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo compuesto por:

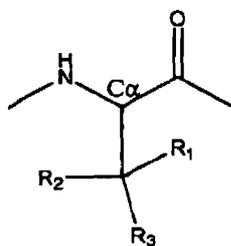
HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH₂,

HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG,

HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂, y

XaaAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR;

en el que Xaa es un residuo de aminoácido, X es un análogo de aminoácido de la Fórmula II:



(II)

en la que

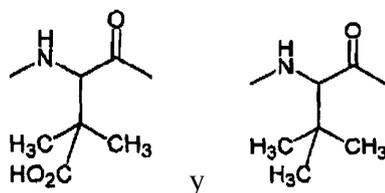
R₁ y R₂ son seleccionados independientemente de un alquilo C₁-C₁₀ o un halógeno;

R₃ es elegido entre alquilo C₁-C₁₀, arilo, un grupo hidroxilo, -(CH₂)_m-COOH, -(CH₂)_m-NH₂, -(CH₂)_m-N-C(=NH)NH₂, -(CH₂)_m-C(=O)NH₂, -SH, o -(CH₂)_m-S-CH₃; y m es 0, 1 ó 2;

y en la que el alquilo incluye tanto cadenas de alquilo no sustituidas, como sustituidas, que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo, estos incluyen un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (como un tioéster, un tioacetato, o un

5 tioformato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, un ciano, un nitro, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un fragmento aromático o heteroaromático, o los
 10 fragmentos sustituidos en la cadena hidrocarburo pueden ser sustituidos ellos mismos e incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y grupos sililo, así como también éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y
 15 ésteres), -CF₃, -CN.

15. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteinasa, o variante de GLP-1, según la reivindicación 14 en el que X se selecciona del grupo compuesto por:



- 15 16. El uso de un análogo de GLP-1 o de una variante de GLP-1 resistente a la proteínasa que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por:

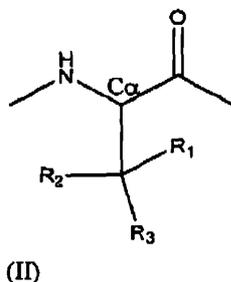
HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH₂,

HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG,

HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂, y

20 XaaAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR;

en el que Xaa es un residuo de aminoácido y X es un análogo de aminoácido de la Fórmula II:



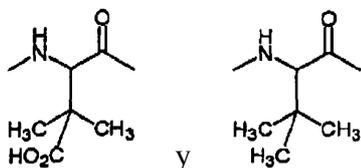
25

en la que

R₁ y R₂ son seleccionados independientemente de un alquilo C₁-C₁₀ o un halógeno;

R_3 es elegido entre alquilo C_1 - C_{10} , arilo, un grupo hidroxilo, $-(CH_2)_m-COOH$, $-(CH_2)_m-NH_2$, $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$, $-SH$, o $-(CH_2)_m-S-CH_3$; y m es 0, 1 ó 2; y

- 5 en la que el alquilo incluye tanto cadenas de alquilo no sustituidas, como sustituidas, que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo, estos incluyen un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo, o un acilo), un tiocarbonilo (como un tioester, un tioacetato, o un tioformato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, un ciano, un nitro, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o un fragmento aromático o heteroaromático, o los
- 10 fragmentos sustituidos en la cadena hidrocarburo pueden ser sustituidos ellos mismos e incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y grupos sililo, así como también éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y ésteres), $-CF_3$ y $-CN$, para la fabricación de un medicamento para tratar o
- 15 prevenir una enfermedad o afección seleccionada entre enfermedades relacionadas con el corazón, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia, complicaciones diabéticas, hipertensión relacionada con la obesidad, osteoporosis, depresión, trastorno esquizoafectivo, apnea del sueño, síndromes de déficit de atención con problemas de concentración, pérdida de memoria, olvido, narcolepsia y enfermedades gastrointestinales.
- 20
- 25 17. El uso de la reivindicación 16 en el que X es seleccionada del grupo compuesto por:



18. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad relacionada con el corazón seleccionada entre infarto de
- 30 miocardio, lesión de isquemia y reperfusión, insuficiencia cardiaca congestiva y paro cardiaco.
19. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad o afección es seleccionada entre la depresión, trastorno esquizoafectivo, apnea del sueño, síndromes de déficit de atención, pérdida de memoria, olvido, y narcolepsia.

20. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad gastrointestinal elegida entre una enteritis regional (enfermedad de Crohn) y una enfermedad inflamatoria intestinal.

5 21. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteinasa, o variante de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15 para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad o afección seleccionada entre enfermedades relacionadas con el corazón, hiperglucemia, obesidad, hiperlipidemia, complicaciones diabéticas, hipertensión relacionada con la obesidad, osteoporosis, depresión, trastorno esquizoafectivo, apnea del sueño,
10 síndromes de déficit de atención con problemas de concentración, pérdida de memoria, olvido, narcolepsia, y enfermedades gastrointestinales.

22. Un análogo de GLP-1 resistente a la proteinasa, o variante de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 y 14, o 15 para su uso como medicamento.

15

DEGRADACIÓN RÁPIDA DE GLP-1 POR DPP IV
-2 MIN TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA
-30 MIN TRAS LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA

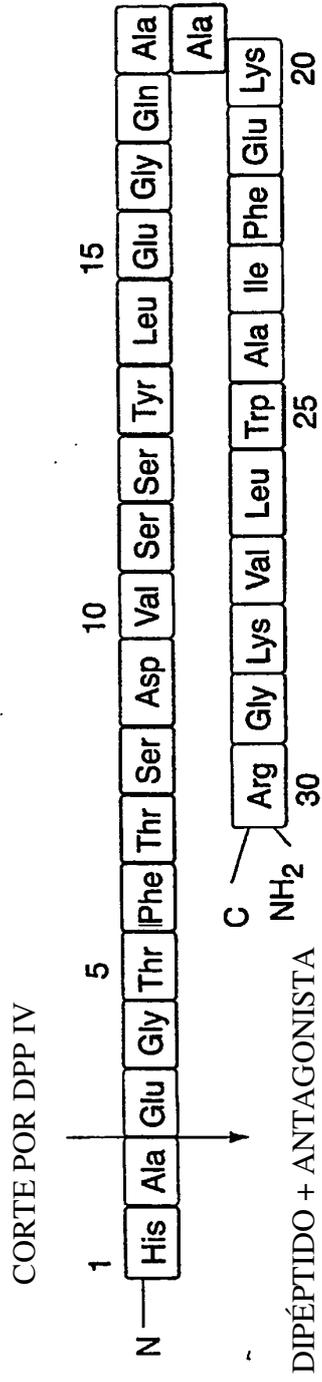


Fig. 1

RESISTENCIA A LA ESCISIÓN DE DPP-IV

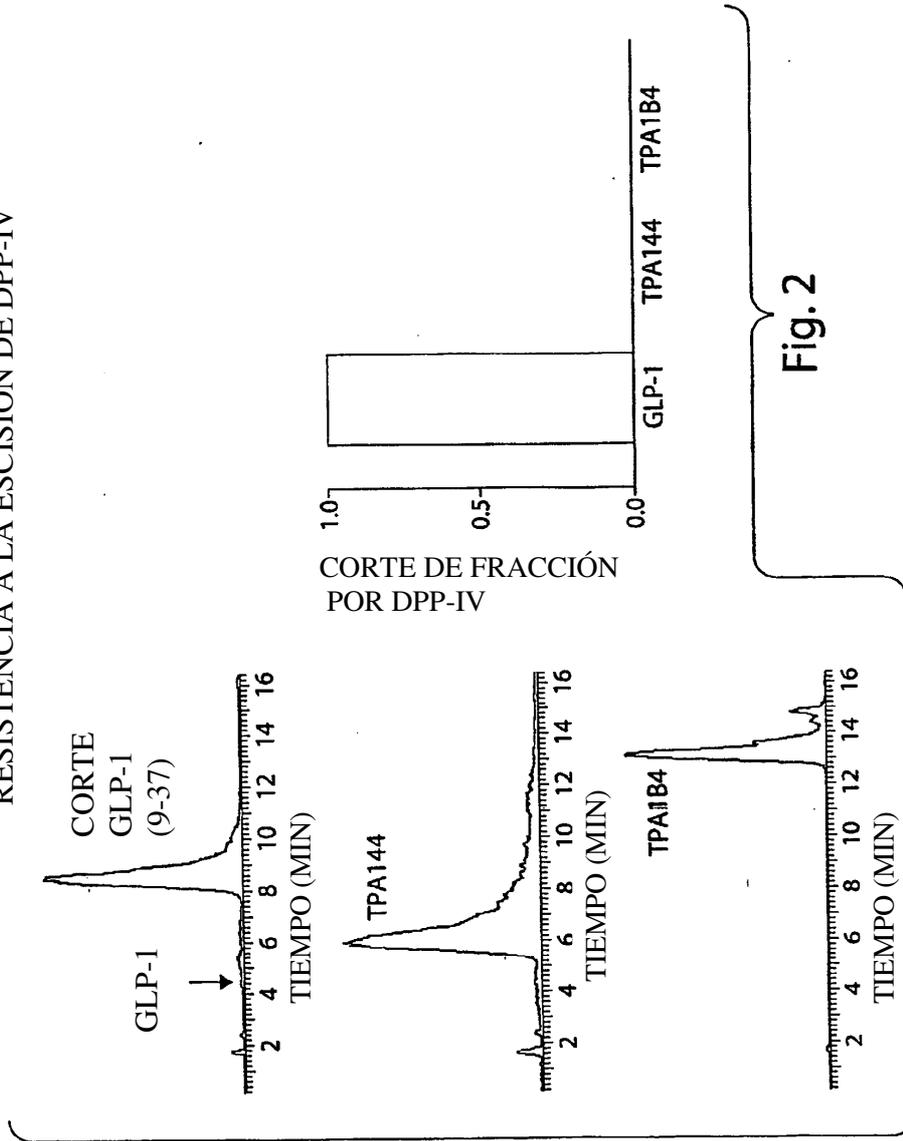


Fig. 2

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE GLP-1 3-DIMETIL-ASPARTATO

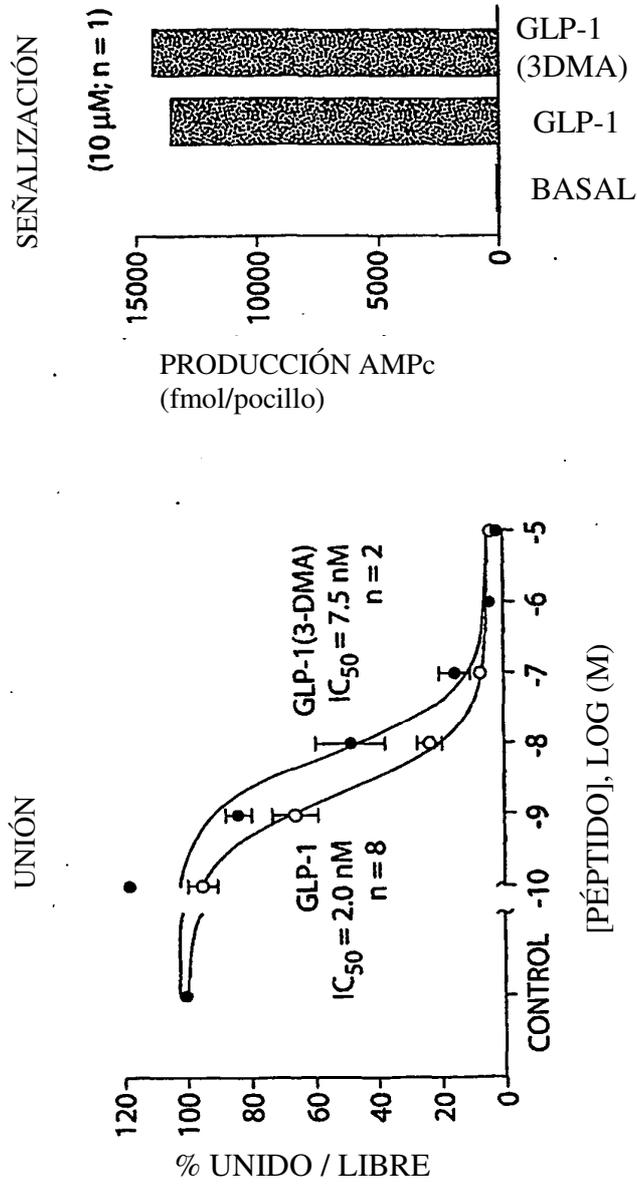


Fig. 3

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR
DE GLP-1 3-BUTIL-METIL-GLICINA

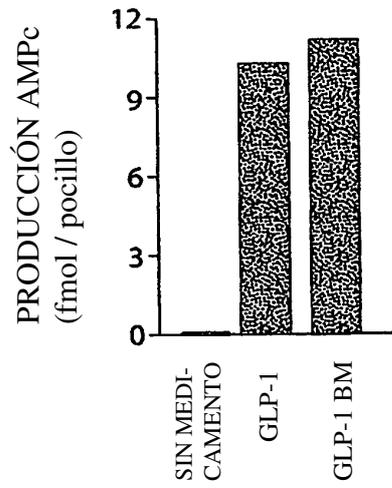


Fig. 4

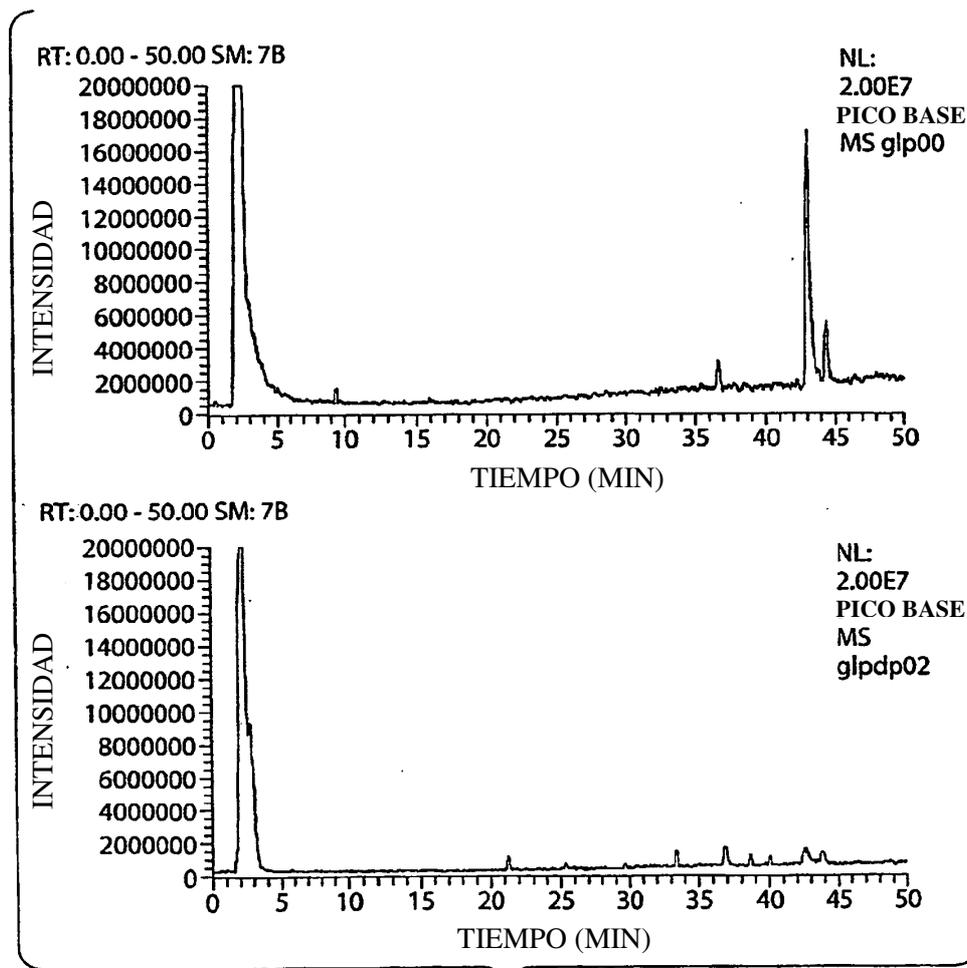


Fig. 5

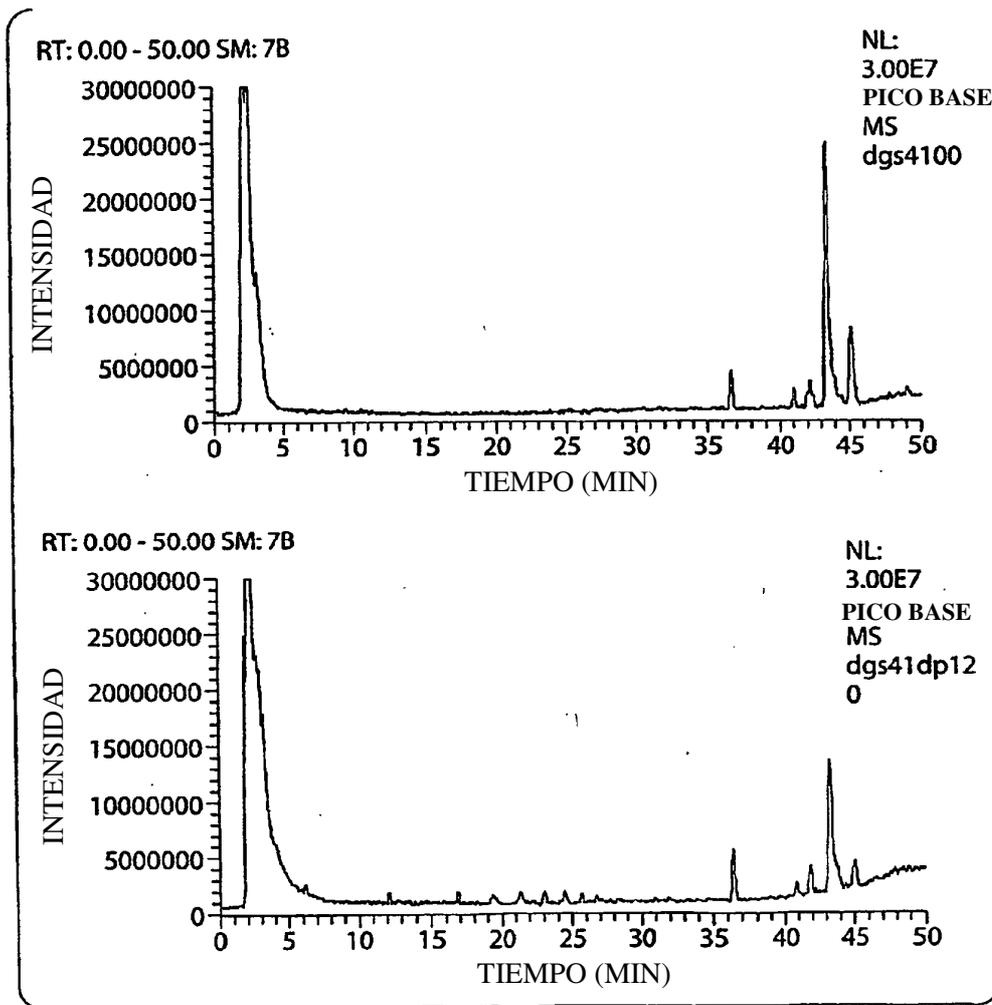


Fig. 6

LA LEUCINA TERCIARIA (Tle) EN POSICIÓN P'1 PRODUCE UN ANÁLOGO PEPTÍDICO RESISTENTE A LA ESCISIÓN POR TROMBINA

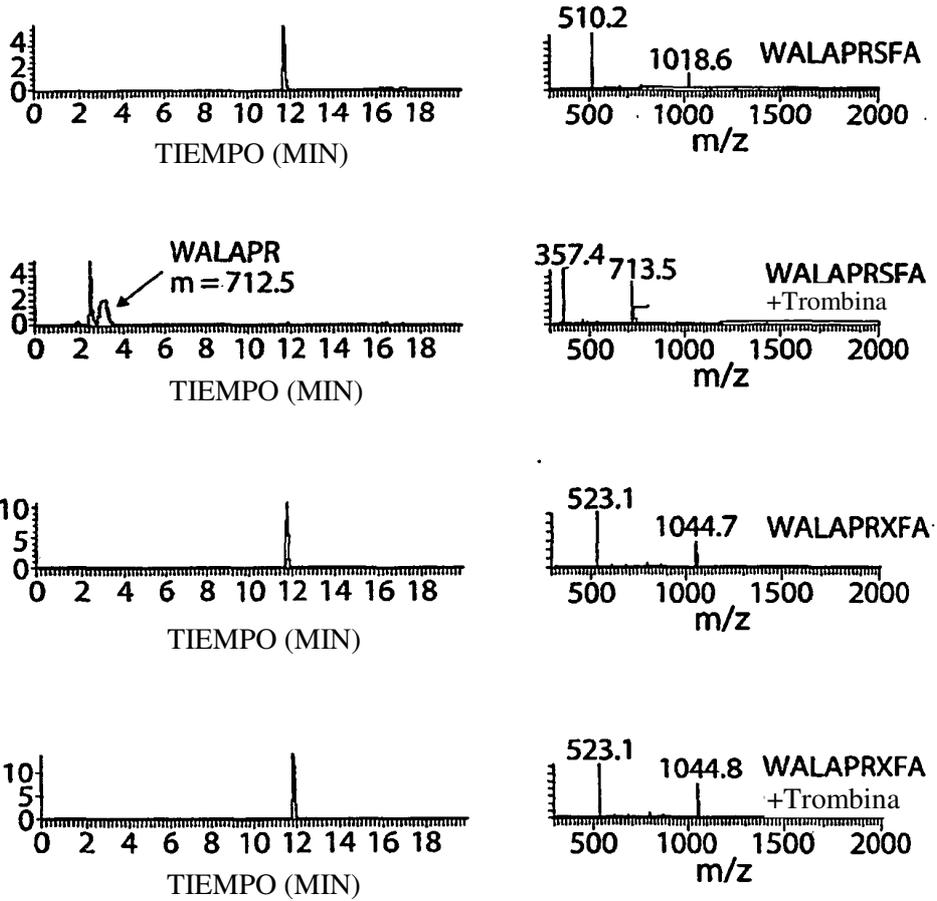


Fig. 7

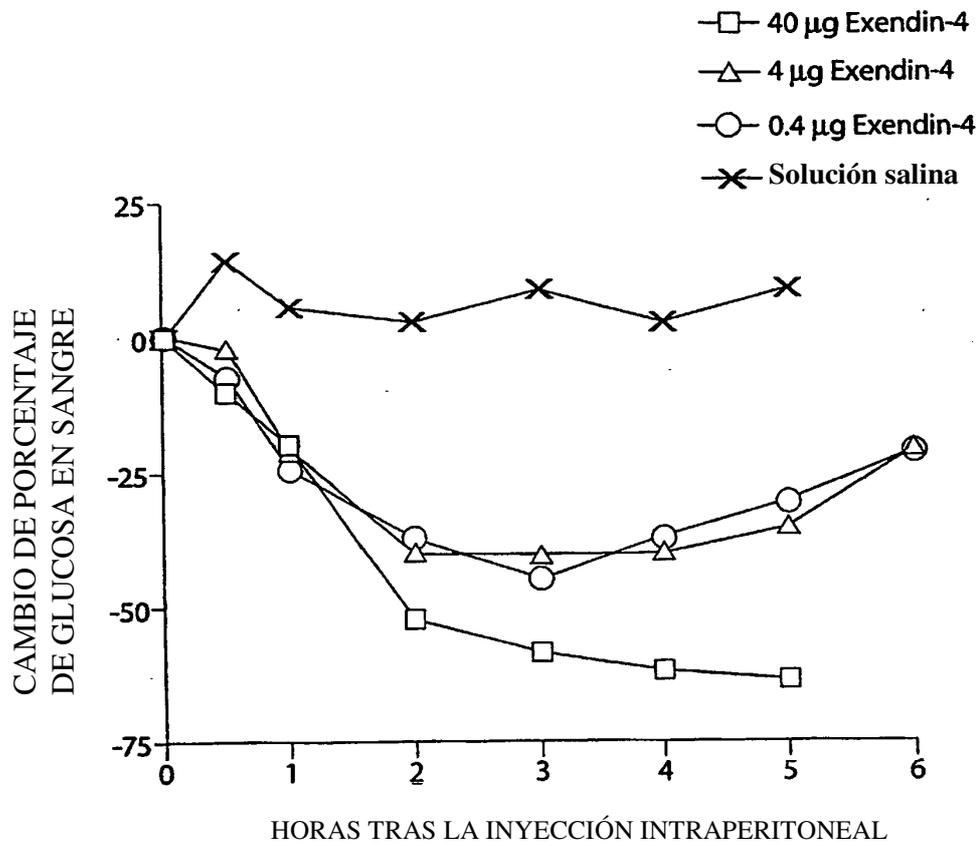


Fig. 8

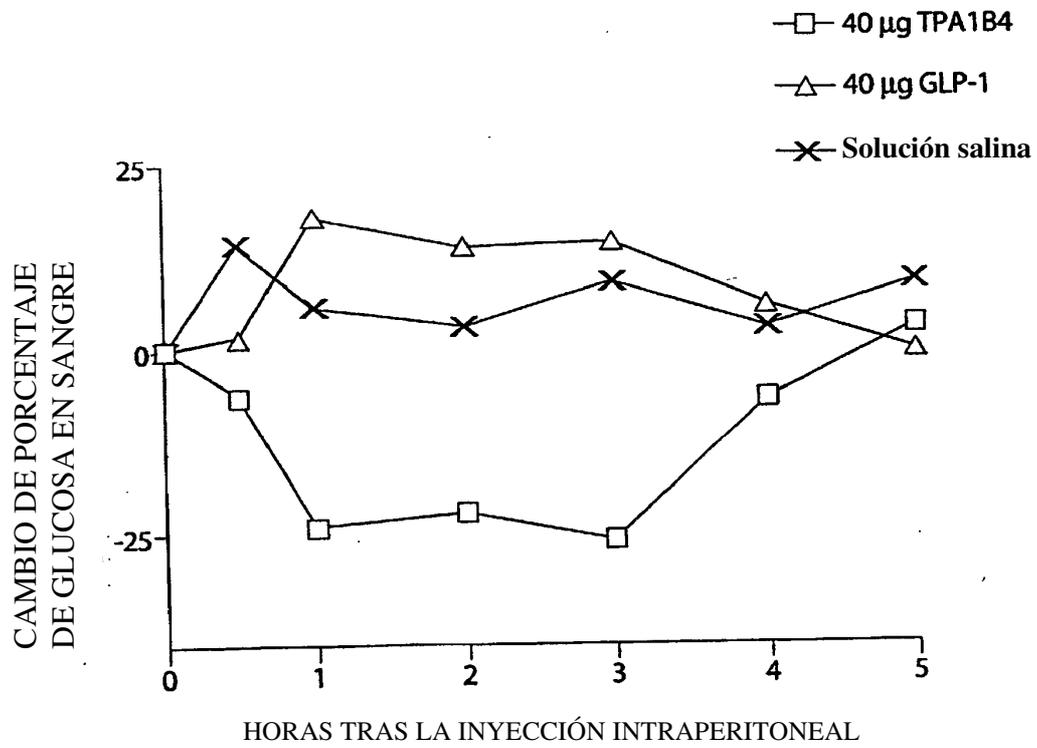


Fig. 9

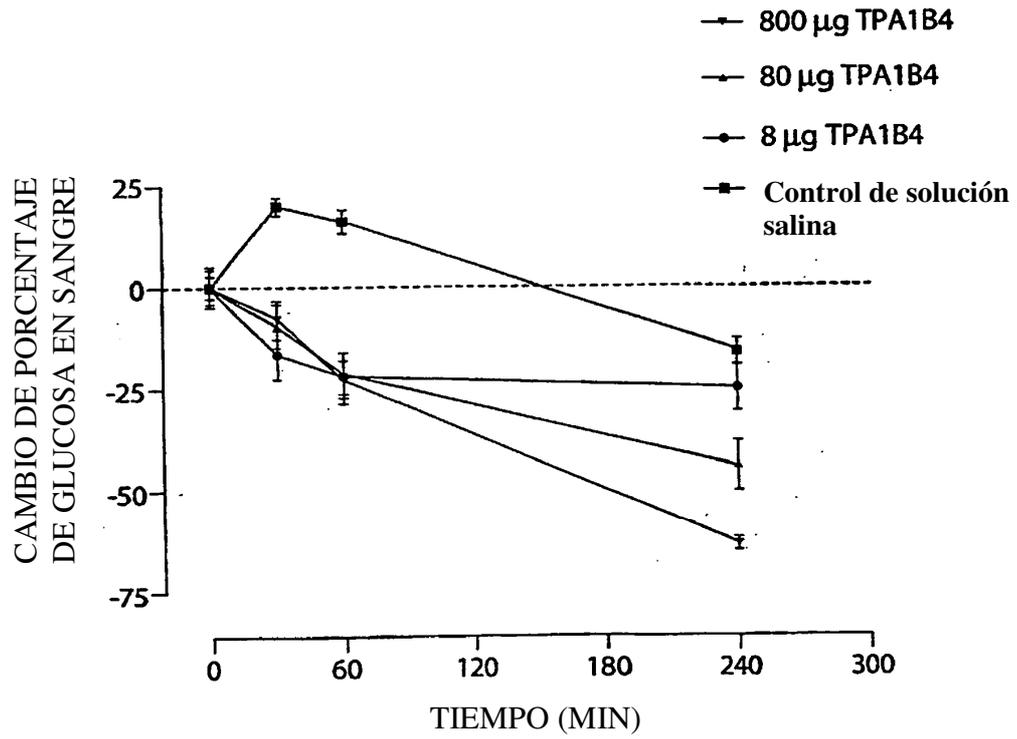


Fig. 10

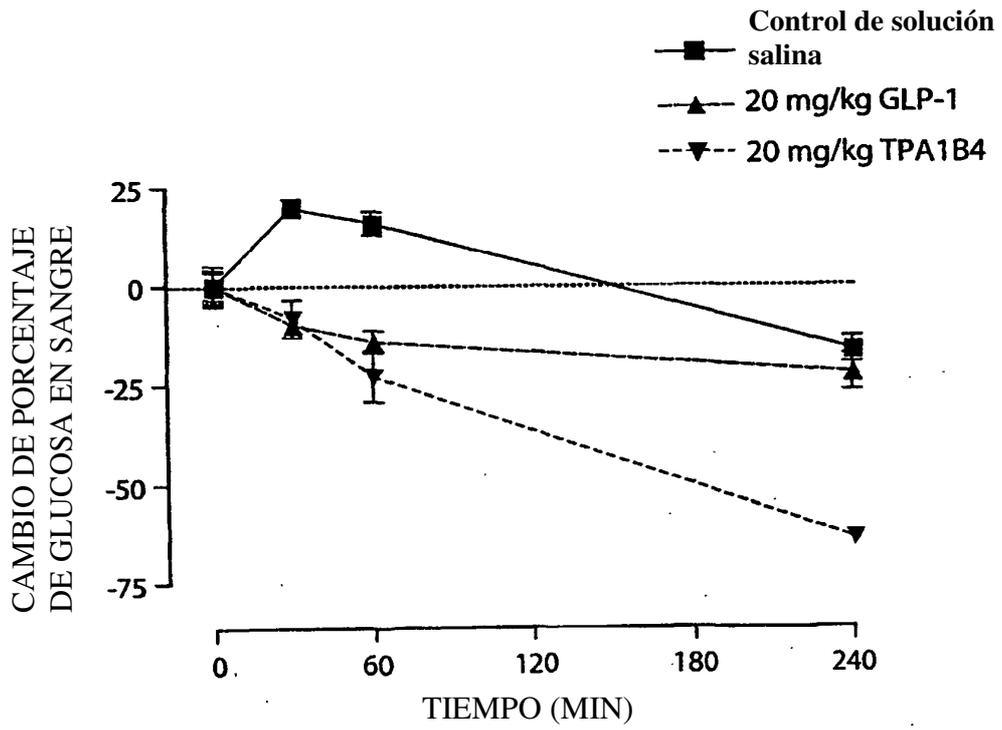


Fig. 11

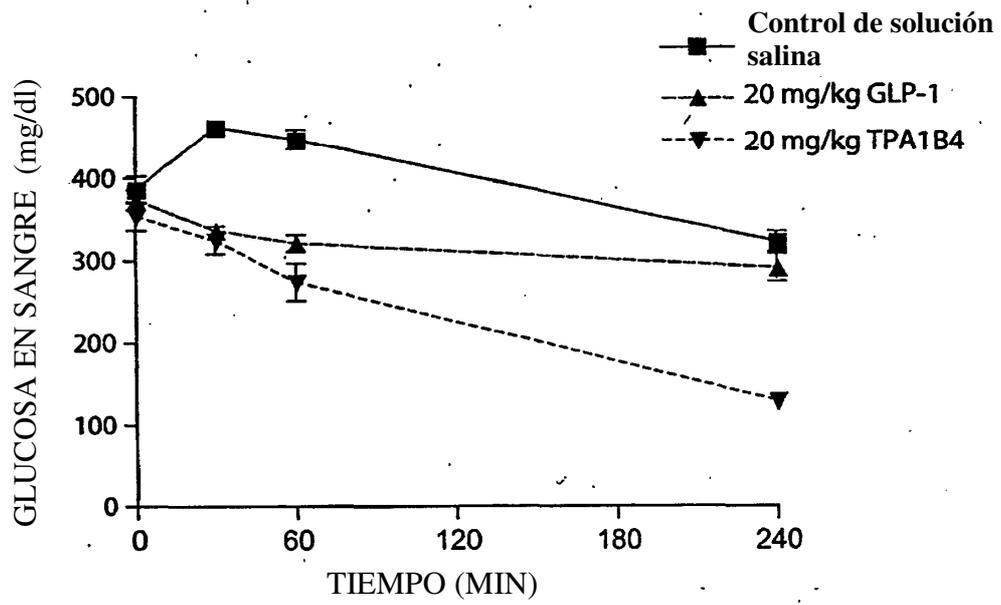


Fig. 12

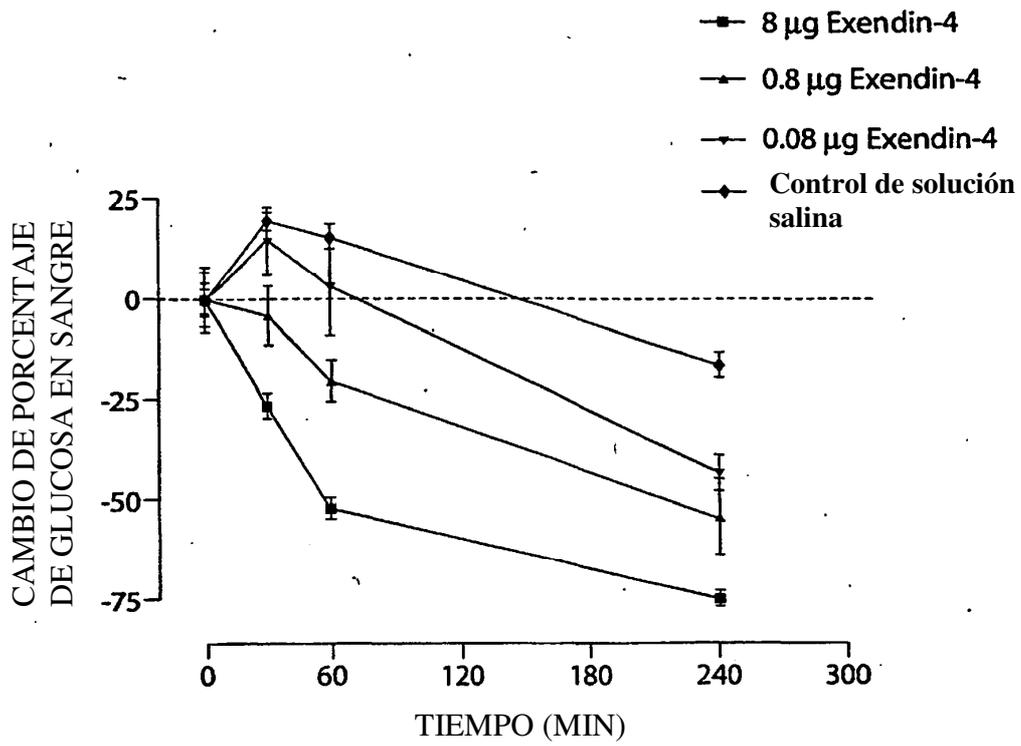


Fig. 13

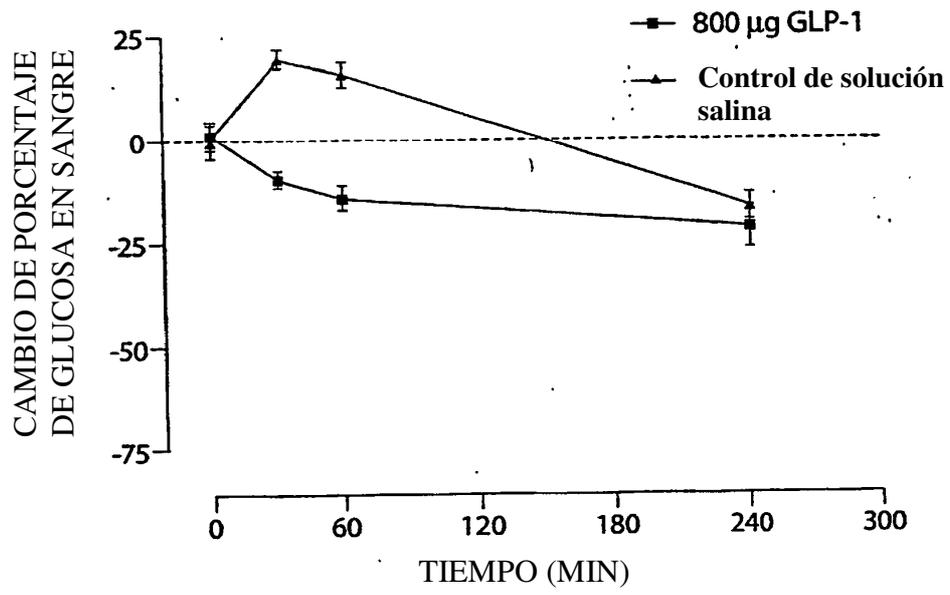


Fig. 14

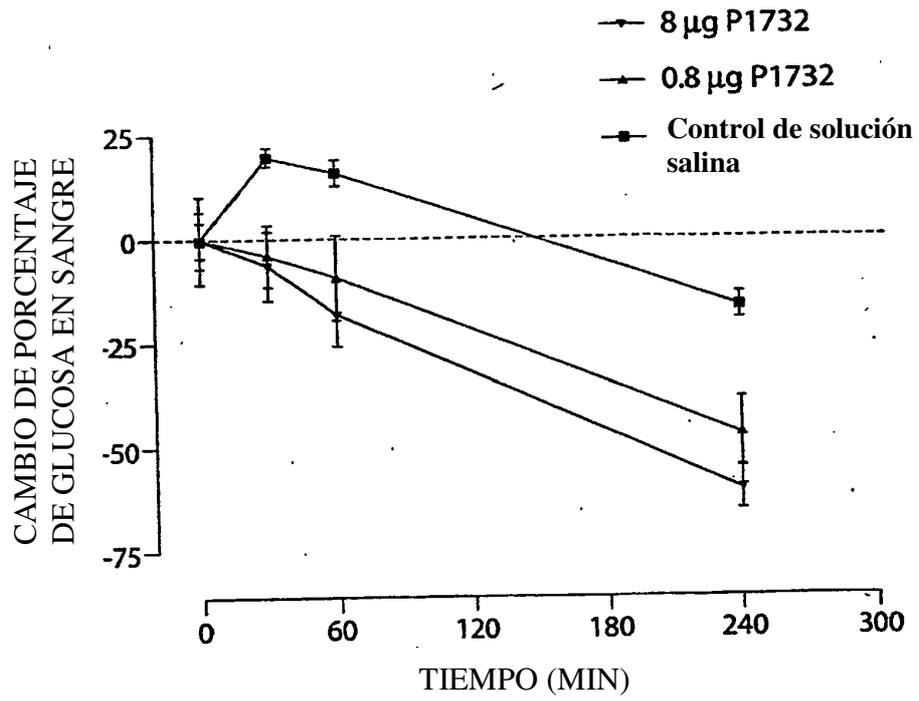


Fig. 15

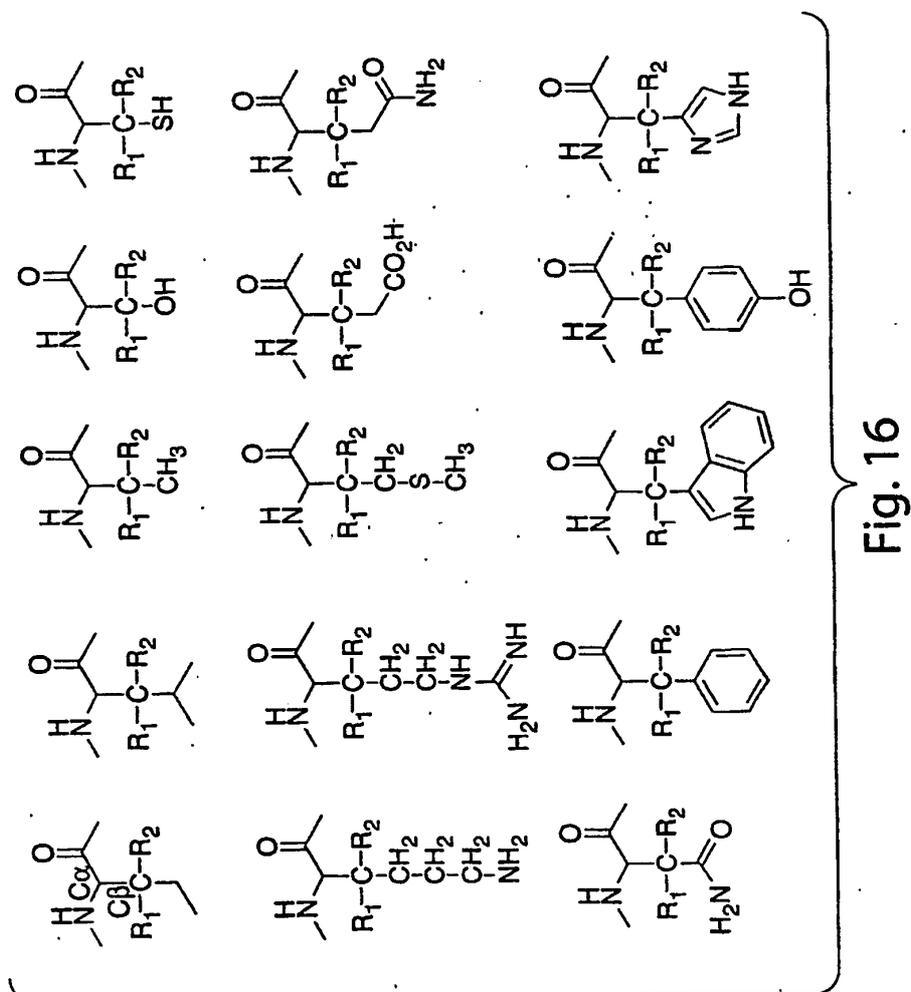


Fig. 16