

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 963**

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03005786 .3**
96 Fecha de presentación: **12.07.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1329458**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2003**

54 Título: **Péptidos que reducen los niveles de glucosa en sangre**

30 Prioridad:
12.07.1999 US 143591 P
09.08.1999 EP 99610043

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
Zealand Pharma A/S
Smedeland 36
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es:
Larsen, Bjarne Due;
Mikkelsen, Jens Damsgaard y
Neve, Soren

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 384 963 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos que reducen los niveles de glucosa en sangre

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos péptidos agonistas de la actividad del GLP-1. Más específicamente la invención se refiere a conjugados peptídicos que comprenden variantes del GLP-1, que son farmacológicamente activos y estables, y como agonistas de la actividad de GLP-1 son útiles en el tratamiento de enfermedades que se benefician de la regulación de los niveles excesivos de glucosa en sangre y/o de la regulación del vaciado gástrico, tales como la diabetes y los trastornos alimenticios. La presente invención se refiere también a métodos para preparar dichos péptidos, a una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que comprende un péptido de la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable, y a dicho péptido para uso en terapia.

Antecedentes de la invención

Varias hormonas que reducen los niveles de glucosa en sangre se liberan de la mucosa gastrointestinal en respuesta a la presencia y absorción de nutrientes en el intestino. Estas hormonas incluyen gastrina, secretina, polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) y péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). La sustancia más potente conocida es el GLP-1 (Ørskov, 1992, *Diabetologia* 35: 701-711). El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) es un producto del proglucagón, un péptido de 180 aminoácidos (Drucker, 1998, *Diabetes* 47: 159-169). La secuencia total del proglucagón contiene la secuencia de 29 aminoácidos del glucagón, la secuencia de 36 o 37 aminoácidos del GLP-1 y la secuencia de 34 aminoácidos del péptido 2 similar al glucagón (GLP-2), un péptido intestino-trófico. El GLP-1 tiene varias funciones. Es una hormona fisiológica que aumenta el efecto sobre la secreción de insulina en los seres humanos normales y es por lo tanto una hormona incretina. Además, el GLP-1 reduce también las concentraciones de glucagón, ralentiza el vaciado gástrico, estimula la biosíntesis de (pro)insulina, y aumenta la sensibilidad a la insulina (Nauck, 1997, *Horm. Metab. Resp.* 47: 1253-1258). El péptido aumenta también la capacidad de las células β para percibir y responder a la glucosa en sujetos con alteración de la tolerancia a la glucosa. (Byrne, 1998, *Eur. J. Clin. Invest.* 28: 72-78). El efecto insulínico del GLP-1 en los seres humanos incrementa la velocidad de desaparición de la glucosa en parte debido al aumento de los niveles de insulina y en parte debido al aumento de la sensibilidad a la insulina (D'Alessio, 1994, *Eur. J. Clin. Invest.* 28: 72-8). Esto ha situado al GLP-1 como un agente prometedor para el tratamiento de la diabetes tipo II. Se ha encontrado que los fragmentos activos del GLP-1 son el GLP-1(7-36) y el GLP-1(7-37). Sin embargo, un problema farmacológico importante con el GLP-1 natural es su corta semivida. En los seres humanos y en las ratas, el GLP-1 se degrada rápidamente por la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) hasta GLP-1(9-36)amida, que actúa como un antagonista del receptor de GLP-1 endógeno (Deacon, 1998, *Diabetologia* 41: 271-278). Se han propuesto varias estrategias que evitan este problema, algunas usan inhibidores de DPP-IV y otras, análogos de GLP-1(7-36)amida resistentes a DPP-IV (Deacon, 1998, *Diabetologia* 41: 271-278; Deacon *et al.*, 1998, *Diabetes* 47: 764-769; Ritzel, 1998, *J. Endocrinol.* 159: 93-102; Patente de EE.UU. N° 5.545.618; Pederson, 1998, *Diabetes* 47: 1253-1258).

Las exendinas, otro grupo de péptidos que reducen los niveles de glucosa en sangre, tienen cierta similitud de secuencia (53 %) con GLP-1[7-36]NH₂ (Goke *et al.* 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 19650-55). Las exendinas se encuentran en el veneno de Helodermatidae o lagartos de cuentas (Raufman, 1996, *Reg. Peptides* 61: 1-8). La exendina-3 está presente en el veneno de *Heloderma horridum*, el lagarto de cuentas mexicano y la exendina-4 está presente en el veneno de *Heloderma suspectum*, el monstruo de Gila. La exendina-4 difiere de la exendina-3 sólo en las posiciones dos y tres. Se ha clonado y secuenciado el cDNA que codifica la proteína precursora de exendina-4, un péptido de 47 aminoácidos fusionado al amino terminal de la exendina-4 (Pohl *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 9778-9784 y el documento WO98/35033). Tanto la exendina-3 como la exendina-4, estimulan un aumento en la producción de cAMP celular en las células acinares pancreáticas del conejillo de Indias por interacción con receptores de exendina (Raufman, 1996, *Reg. Peptides* 61: 1-18). La exendina-3 causa un incremento bifásico en la producción de cAMP celular, pero un incremento monofásico en la liberación de amilasa en las células acinares pancreáticas. En cambio, la exendina-4 causa un incremento monofásico en la producción de cAMP y no altera la liberación de amilasa.

La exendina-4 es un fuerte agonista del receptor de GLP-1 en células de insulinomas de rata aisladas (Goke *et al.* 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 19650-55). Esto es previsible porque el dominio (His Ala) del GLP-1 reconocido por la DPP-IV no está presente en la exendina-4 (Goke *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 19650-55). La unión de [¹²⁵I]GLP-1 al núcleo del tracto solitario se inhibió en dependencia de la concentración mediante GLP-1 no marcado y [Tyr39]exendina-4 con valores de K_i de 3,5 y 9,4 nM, respectivamente, y se encuentran valores similares en líneas celulares (Goke *et al.*, 1995, *Eur. J. Neurosci.* 7: 2294-2300 y Goke *et al.* 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 19650-55). Además, la exendina-4 administrada sistémicamente reduce los niveles de glucosa en sangre en un 40 % en ratones diabéticos db/db (documento WO99/07404). Recientemente, Grieg *et al.* (1999, *Diabetologia* 42: 45-50) han demostrado un efecto de larga duración en la reducción de los niveles de glucosa en sangre con una inyección diaria intraperitoneal de exendina-4 a ratones diabéticos *ob/ob*. La patente de EE.UU. N° 5.424.286 describe que una porción considerable de la secuencia N-terminal es esencial para conservar la actividad insulínica (exendina-4(1-31) e Y³¹-exendina-4(1-31)) mientras que una exendina con el extremo N-terminal truncado (exendina-4(9-39)) tiene propiedades inhibitorias.

Se ha propuesto el uso de exendina-3, exendina-4 y agonistas de exendina para el tratamiento de la diabetes mellitus, por reducción de la motilidad gástrica y retraso del vaciado gástrico, y para la prevención de la hiperglucemia (Patente de EE.UU. N° 5.424.286, documento WO98/05351) así como para la reducción de la ingesta de alimentos (documento WO98/30231). Se han propuesto formas de obtener nuevos compuestos modificando las

5

secuencias de la exendina natural. Una forma es incorporar sustituyentes lipófilos a la molécula, por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/43708 que describe derivados de exendina con un sólo sustituyente lipófilo incorporado al residuo de aminoácido C-terminal.

10

Una aproximación importante ha sido diseñar análogos de exendina caracterizados por sustituciones de aminoácidos y/o por el truncamiento en C-terminal de la secuencia de exendina-4 natural. Esta aproximación se representa por los compuestos de los documentos WO99/07404, WO99/25727 y WO99/25728.

15

El documento WO99/07404 describe los agonistas de exendina que tienen una fórmula general I que define una secuencia peptídica de 39 residuos de aminoácidos con Gly Thr en las posiciones 4-5, Ser Lys Gln en las posiciones 11-13, Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu en las posiciones 15-21, Leu Lys Asn Gly Gly en las posiciones 26-30, Ser Ser Gly Ala en las posiciones 32-35, y en la que las posiciones restantes pueden estar ocupadas por residuos de aminoácidos de la exendina natural o pueden estar ocupadas por sustituciones de aminoácidos específicos. La fórmula I no incluye ningún agonista de exendina ni análogos que tengan delecciones de aminoácidos específicos y/o que estén conjugados como se describe en la presente memoria, tales como los nuevos compuestos desPro³⁶-exendina-4(1-39), exendina-4(1-39)-K₆ o desPro³⁶-exendina-4(1-39)-K₆.

20

25

El documento WO 99/25727 describe agonistas de exendina que tienen una fórmula general I que define una secuencia peptídica de 28 a 38 residuos de aminoácidos con Gly en la posición 4 y Ala en la posición 18, y en la que las posiciones restantes pueden estar ocupadas por residuos de aminoácidos de la exendina natural o pueden estar ocupadas por sustituciones de aminoácidos específicos. La fórmula I no comprende una secuencia peptídica que tenga Ser como aminoácido C-terminal ni agonistas o análogos de exendina que tengan delecciones de aminoácidos específicos y/o que estén conjugados como se describe en la presente memoria, tales como los nuevos compuestos desPro³⁶-exendina-4(1-39), exendina-4(1-39)-K₆ o desPro³⁶-exendina-4(1-39)-K₆. Además, la fórmula II del documento WO99/25727 define una secuencia peptídica similar a la fórmula I, pero que incluye derivados de exendina que tienen un sustituyente de alcanilo C(1-10) o cicloalquilalcanoilo sobre la lisina en la posición 27 o 28.

Al tratar niveles posprandiales inadecuados de glucosa en sangre, los compuestos se administran frecuentemente, por ejemplo una, dos o tres veces al día.

30

El documento WO 99/25728 describe los agonistas de exendina que tienen una fórmula general I que define una secuencia peptídica de 28 a 39 residuos de aminoácidos con una Ala fija en la posición 18, y en la que las posiciones restantes pueden estar ocupadas por residuos de aminoácidos de la exendina natural o pueden estar ocupadas por sustituciones de aminoácidos específicos. Dichos agonistas de exendina corresponden todos a un análogo de exendina truncado que tiene sustituciones de aminoácidos en grado variable. Las secuencias peptídicas de 34 a 38 residuos de aminoácidos no tienen Ser C-terminal. Una secuencia peptídica de 39 residuos de aminoácidos puede tener Ser o Tyr en el extremo C-terminal, pero ningún otro residuo. La fórmula I no comprende los agonistas o análogos de exendina que tienen delecciones de aminoácidos específicos y/o que están conjugados de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria. Además, la fórmula II define una secuencia peptídica similar a la fórmula I, pero que incluye derivados de exendina que tienen un sustituyente de alcanilo C(1-10) o cicloalquilalcanoilo sobre la lisina en la posición 27 o 28.

35

40

El documento WO 99/46283 (publicado el 16-09-99) describe conjugados peptídicos que comprenden un péptido X farmacológicamente activo y una secuencia peptídica estabilizante Z de 4-20 residuos de aminoácidos unida covalentemente a X, donde dichos conjugados se caracterizan por tener un aumento de la semivida en comparación con la semivida de X. X puede ser exendina-4 o exendina-3.

45 Sumario de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado peptídico que comprende un péptido X seleccionado entre GLP-1 (7-36) y GLP-1 (7-37), que tiene al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

50

- (i) sustitución de la alanina en la posición 8 por D-alanina, glicina o ácido alfa-amino-isobutírico; y
- (ii) un sustituyente lipófilo;

en el que el péptido GLP-1 está acoplado por medio de su terminal N o C a una secuencia de aminoácidos Z, donde Z tiene la secuencia (Lys)_n, en la que n es un número entero en el intervalo de 4 a 15; o una sal farmacéuticamente aceptable o una amida C-terminal de dicho conjugado peptídico.

55

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado farmacéuticamente activo como se define en esta memoria, para uso en terapia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado

peptídico farmacéuticamente activo como se define en esta memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo como se define en esta memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una serie de enfermedades como se indica en las reivindicaciones.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto del Compuesto 1 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂) sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones, véase el Ejemplo 25.

La Figura 2 muestra el efecto del Compuesto 2 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂) sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones, véase el Ejemplo 25.

- 10 La Figura 3 muestra el efecto del Compuesto 5 (Gly⁸, Lys³⁷ (palmitoil)-GLP1-(7-36)(Humano)-(Lys)₇-NH₂) sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones, véase el Ejemplo 25.

La Figura 4 muestra la cinética de degradación *in vivo* en conejos después de inyección i.v. de 1 µmol/kg del Compuesto 4 y del Compuesto (iii), véase el Ejemplo 27.

- 15 La Figura 5 es un gráfico de los valores de AUC (área bajo la curva) (media ± error estándar de la media (SEM)) para los compuestos 2, 14-16, 18 y 19 en un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), véase el Ejemplo 28.

La Figura 6 muestra un cDNA sintético construido para la expresión heteróloga del Compuesto 2 en levaduras. Se diseñó la nueva construcción pYES0010, véase el Ejemplo 20.

- 20 La Figura 7 es un gráfico de dosis-respuesta en un ensayo de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones db/db basado en valores relativos de AUC_{0-240 min} (media ± SEM) para el Compuesto 2 y el Compuesto (i), véase el Ejemplo 29.

La Figura 8 muestra los efectos de una dosis máxima del Compuesto 2, es decir, 100 nmol/kg i.p., en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) cuando se administró hasta 24 horas antes del OGTT.

Descripción detallada de la invención

- 25 Los compuestos de la presente invención incluyen la conjugación de las nuevas variantes, GLP-1(7-36)-NH₂ modificado, y GLP-1(7-37)-NH₂ modificado con secuencias peptídicas cortas específicas (Z) que proporciona estabilidad a estos compuestos sin comprometer las propiedades farmacológicas. Estas conjugaciones confieren estabilidad e hidrofiliicidad *in vivo* a la molécula peptídica. La secuencia Z está compuesta por residuos de aminoácidos, y ella sola no tiene características estructurales en términos de configuración en hélice α. Sin embargo, a partir de estudios que usan tanto el dicróismo circular como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), la adición de Z altera espectacularmente las características estructurales de algunos péptidos como se pone en evidencia por el aumento de la cantidad de configuración en hélice α en el péptido. Por ejemplo, el dicróismo circular demostró que un (Gly⁸)-GLP-1 modificado con Z tenía mucha más configuración en hélice α que el (Gly⁸)-GLP-1. Unidos a los resultados farmacológicos, los análisis estructurales sugieren que Z está modificando la configuración del péptido lo que lleva a una mayor estabilidad enzimática, pero sin perder su potencia. También las propiedades físicas y químicas de los péptidos se pueden alterar considerablemente por la modificación por Z con el consiguiente impacto sobre la estrategia de formulación farmacológica.
- 30
- 35

GLP-1 modificado

- Un GLP-1 modificado preferido incluido en esta memoria como péptido X en los conjugados peptídicos tiene una secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36)-NH₂ o GLP-1(7-37) que tiene una sustitución de alanina por glicina en la posición 8. Alternativamente, un GLP-1 modificado preferido tiene una secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) que tiene una sustitución de alanina por glicina en la posición 8 y un sustituyente lipófilo, preferiblemente palmitoil, sobre un residuo de lisina en la posición 26, 34 o 37. El sustituyente lipófilo está preferiblemente unido al grupo epsilon-amino de dicha lisina e incluye las realizaciones específicas descritas antes para las variantes de exendina. El GLP-1(7-36) o el GLP-1(7-37) modificados usados como X en los conjugados de la invención pueden ser los citados en los documentos WO 99/43707 y WO 98/08871 que comprenden un sustituyente lipófilo o más preferiblemente aquellos análogos de GLP-1 que tienen una sustitución de glicina en la posición 9. Los péptidos X preferidos son
- 40
- 45

- 50 (Gly⁸)-GLP-1(7-36),
(Gly⁸)-GLP-1(7-37), y
(Gly⁸)-GLP-1(7-36)-Lys³⁷(palmitoil)

Los compuestos de la invención que tienen un sustituyente lipófilo deben tener un perfil de acción más prolongado que los péptidos parentales como se demuestra para los derivados de GLP-1 en el documento WO 98/08871.

Conjugados peptídicos

La secuencia peptídica Z puede estar unida al extremo C-terminal o N-terminal de la secuencia peptídica X. o dos secuencias peptídicas pueden estar unidas individualmente tanto al C-terminal como al N-terminal de X. En el caso en que el péptido nativo X tenga un ácido carboxílico con C-terminal libre, la secuencia peptídica Z puede estar unida o al C-terminal del péptido X o al N-terminal del péptido X. o el C-terminal y el N-terminal de X pueden estar unidos ambos a cada secuencia peptídica individual Z. Alternativamente, Z puede estar unida al átomo de nitrógeno de la cadena lateral de lisina, histidina o arginina o una función carbonilo en la cadena lateral de ácido glutámico o ácido aspártico en cualquier lugar dentro de la secuencia peptídica X. En una realización, Z puede estar unida a X dentro de la secuencia y al N-terminal y/o C-terminal de X. El que la secuencia deba estar unida a la secuencia peptídica X en su C-terminal, en su N-terminal, o en ambos, o dentro de la secuencia peptídica X depende del péptido específico X y puede ser determinado fácilmente por los expertos en la técnica. Preferiblemente, X está unida a Z mediante un enlace peptídico y preferiblemente en el C-terminal de X.

Un aspecto de la invención se dirige a un conjugado peptídico que comprende un péptido X que reduce el nivel de glucosa en sangre en un mamífero, en el que X es GLP-1 (7-36) o GLP-1 (7-37) que tiene al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en: (i) sustitución de la alanina en la posición 8 por D-alanina, glicina o ácido alfa-aminobutírico (Aib) y (ii) un sustituyente lipófilo, en el que el péptido GLP-1 se acopla por su N o C terminal a una secuencia de aminoácidos Z, donde Z tiene la secuencia (Lys)_n, en la que n es un número entero en el intervalo de 4 a 15; o una sal farmacéuticamente aceptable o una amida de C-terminal de dicho conjugado peptídico. Preferiblemente, X se une al receptor de GLP-1.

Z es típicamente una secuencia peptídica de 4-15 residuos de aminoácidos, por ejemplo, de 4, 5, 6, 7, 8 o 10 residuos de aminoácidos, en la que se prefieren 6 residuos de aminoácidos. Los aminoácidos mencionados antes pueden tener configuración D o L, pero preferiblemente los aminoácidos mencionados antes tienen una configuración L. En una realización preferida de la invención.

Ejemplos de secuencias peptídicas adecuadas, en las que los residuos de aminoácidos de Z son idénticos, son por ejemplo, (Lys)_n, en la que n es un número entero en el intervalo de 4 a 15, preferiblemente en el intervalo de 4 a 10, tal como en el intervalo de 4 a 8, por ejemplo, en el intervalo de 4 a 7, por ejemplo, Lys₄, Lys₅, Lys₆, Lys₇. Se prefiere (Lys)₆ unida mediante enlace peptídico al extremo C-terminal de X.

En realizaciones preferidas de la invención, la relación entre la dosis oral mínima eficaz de dicho conjugado peptídico y la dosis oral mínima eficaz de dicho péptido X es al menos 1:5.

Se debe entender que los conjugados peptídicos de la invención también pueden estar en la forma preferida de amida (NH₂) o de ácido libre (OH) o en la forma de una de sus sales. Ejemplos de conjugados peptídicos de la invención son

Gly⁸-GLP-1 (7-36)~Lys₆-NH₂
 (Gly⁸-Lys³⁷(palmitoil)-GLP-1(7-36)(Humano)-Lys₇-NH₂
 Ser⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₆-NH₂,
 Aib⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₆-NH₂,
 Lys₆-Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₆-NH₂,
 Lys₆-Gly⁸-GLP-1 (7-36)-NH₂,
 (Gly⁸,Lys²⁶(palmitoil)-GLP-1(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂,
 (Gly⁸,Lys³⁴(palmitoil)-GLP-1(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂,
 Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys⁸-NH₂,
 Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₁₀-NH₂,
 Gly⁸-GLP-1 (7-37)-Lys₆-NH₂,

y el ácido libre de los mismos y una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización más específica, los conjugados se seleccionan del grupo que consiste en Gly⁸-(GLP-1-(7-36)(Humano)-NH₂), Gly⁸-GLP-1-(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂, Gly⁸Lys³⁷(palmitoil)-GLP-1-(7-36)(Humano)-Lys₇-NH₂, Gly⁸Lys³⁴(palmitoil)-GLP-1-(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂.

La provisión de los conjugados peptídicos de la presente invención hace posible que los péptidos que reducen la glucosa en sangre, tales como el GLP-1 y sus análogos activos sean administrados oralmente. En la presente memoria se seleccionan los fragmentos peptídicos terminales Z preferidos para inducir una estructura alfa-helicoidal en el péptido X sin afectar significativamente la actividad deseada de X. Dicha estructura helicoidal estabiliza la cadena peptídica, por ejemplo, contra la degradación, como se evidencia por el aumento de la semivida del conjugado peptídico de 2 a 3 veces, comparada con la del péptido no conjugado, véase la tabla 5 más adelante. La secuencia peptídica Z es la parte del conjugado peptídico responsable de introducir una cierta estructura en la molécula de modo que la dosis mínima eficaz se reduce al menos 5 veces. Preferiblemente, la dosis mínima eficaz se reduce al menos 10 veces, más preferiblemente 25 veces, aún más preferiblemente 40 veces, y lo más preferiblemente 50 veces. Por lo tanto, la presente invención se refiere también al uso de una secuencia peptídica (Z) definida anteriormente para la preparación de dicho conjugado peptídico definido anteriormente.

Así, la invención se refiere también a un conjugado peptídico nuevo que comprende un péptido X, como se define en la presente memoria, y en el que X reduce el nivel de glucosa en sangre de un mamífero, donde la relación entre la dosis oral mínima eficaz de dicho conjugado peptídico y la dosis oral mínima eficaz del péptido X es al menos 1:5.

5 Específicamente, la presente invención incluye un conjugado peptídico indicado en las reivindicaciones para uso en terapia, y en particular para estimular la liberación de insulina, reducir los niveles de glucosa en sangre, reducir la motilidad gástrica, retrasar el vaciado gástrico, inhibir la absorción de alimentos, y/o reducir los niveles de lípidos en plasma mediante la administración del conjugado peptídico a un mamífero.

10 Específicamente, el conjugado peptídico de la presente invención se puede usar en el tratamiento de la diabetes tipo 1 o tipo 2, la obesidad, trastornos alimenticios, hiperglucemia, trastornos metabólicos, enfermedad gástrica y síndrome de resistencia a la insulina.

15 La presente invención se refiere también a los métodos de preparación de dicho conjugado peptídico, mediante tecnología de DNA recombinante que comprende las etapas de (a) introducir en la célula hospedante una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho conjugado y (b) cultivar dicha célula hospedante y (c) aislar dicho conjugado del cultivo o (a) cultivar una célula hospedante recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho conjugado bajo condiciones que permiten la producción de dicho conjugado y (b) aislar dicho conjugado del cultivo.

20 El método se refiere también a métodos para la preparación de dicho conjugado peptídico en los que el péptido X se obtiene mediante métodos de DNA recombinante aislando dicho péptido. A continuación, X se conjuga con Z que se incorpora a un soporte sólido o se ha preparado mediante métodos sintéticos en fase sólida. Además, la invención se refiere a la preparación del conjugado peptídico de la presente invención mediante métodos sintéticos de péptidos. Además, la invención se refiere a la preparación del conjugado peptídico de la presente invención mediante métodos sintéticos de péptidos.

El Compuesto 4 conjugado con el péptido GLP-1 presenta mejor estabilidad en comparación con el Compuesto (iii) no conjugado.

25 **Composiciones**

La invención se refiere también a una composición que comprende el conjugado peptídico de la presente invención en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. Tales composiciones pueden estar en una forma adaptada para la administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), epidural, directa al cerebro e intraperitoneal (i.p.)), rectal, intratraqueal, intranasal, dérmica, vaginal, bucal, ocular, o pulmonar, preferiblemente en una forma adaptada para la administración subcutánea u oral, y tales composiciones se pueden preparar de un modo bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en líneas generales en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y ediciones más recientes y en las monografías de la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences" de Marcel Dekker. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, aerosoles, formas de aplicación tópica, formas líquidas o semilíquidas, tales como soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, micelas o liposomas. Se prefieren las composiciones líquidas adecuadas para administración s.c.. En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se administran subcutáneamente. En una realización preferida alternativa, las composiciones de la presente invención se administran oralmente, y en tales casos una forma de administración preferida es un comprimido o una cápsula.

40 El vehículo o diluyente farmacéutico empleado puede ser un vehículo sólido o líquido convencional. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico o éteres de alquilo inferiores de celulosa. Ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno, soluciones tampón isotónicas y agua. Similarmente, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, sólo o mezclado con una cera. Si se usa un vehículo sólido para administración oral, la preparación se pueden comprimir, poner en una cápsula de gelatina dura en polvo o en forma de pelet o puede estar en forma de una tableta o de un comprimido para chupar. La cantidad de vehículo sólido variará ampliamente, pero normalmente será desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 1 g.

50 Un comprimido típico que se puede preparar por técnicas convencionales de fabricación de comprimidos puede contener:

- Núcleo: 100 mg de compuesto activo (como el compuesto libre de la invención o su sal); 1,5 mg de dióxido de silicio coloidal (Aerosil); 70 mg de celulosa microcristalina (Avicel); 7,5 mg de goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol); estearato de magnesio.
- 55 • Recubrimiento: aproximadamente 9 mg de HPMC; aproximadamente 0,9 mg de *Mywacett 9-40T; *monoglicérido acilado usado como plastificante para el recubrimiento con película.

Si se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en la forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda

o líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la presente invención, preferiblemente un conjugado, disuelto o suspendido en un vehículo líquido, en particular, un vehículo acuoso, para aplicación en aerosol. El vehículo puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, tales como sales de ácidos biliares o éteres de alcoholes superiores y polioxietileno, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

La composición puede estar también en una forma adecuada para inyección o perfusión local o sistémica y, como tal, se puede formular con agua estéril o con una solución salina isotónica o con una solución de glucosa. Las composiciones se pueden esterilizar mediante métodos de esterilización convencionales que son bien conocidos en la técnica. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso o se pueden filtrar bajo condiciones asépticas y liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con la solución acuosa estéril antes de su administración. Preferiblemente, la formulación a utilizar para administración intravenosa, subcutánea y oral será una solución del compuesto activo en un tampón. La preparación se puede producir inmediatamente antes de su uso a partir del principio activo y de la solución tampón estéril. Un método preferido de esterilización puede ser mediante filtración estéril de una solución preparada inmediatamente antes de su uso. La composición puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si es necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tampones, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

Los compuestos de la invención poseen propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, estabilidad con respecto a las enzimas proteolíticas. Estudios de estabilidad *in vitro* con los presentes péptidos y conjugados peptídicos en presencia de enzimas proteolíticas seleccionadas muestran un aumento de las semividas de los nuevos péptidos comparados con los péptidos de la técnica anterior. Así, los compuestos de la invención exhiben una duración de su acción *in vivo* considerablemente prolongada comparada con la de GLP-1 y otros agonistas de GLP-1. Además, los compuestos de la invención estimulan la formación de cAMP. Este efecto se puede demostrar en un ensayo de cAMP, por ejemplo, como se describe en el documento WO 98/08871.

Los compuestos peptídicos de la presente invención son agonistas de la actividad de GLP-1 y/o de la actividad de la exendina-4 y mejoran la tolerancia de la glucosa en sangre en los mamíferos diabéticos como se determina por ensayos conocidos en la técnica para un péptido particular. Ejemplos de tal ensayo se describen en la presente memoria. Así, la invención se refiere también a las variantes de exendina y a los conjugados peptídicos como se han definido antes para uso en terapia, y el uso de los conjugados peptídicos como se han definido antes para la fabricación de una composición farmacéutica para uso en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes tipo 1 o tipo 2, la obesidad, los trastornos alimenticios y el síndrome de resistencia a la insulina.

En realizaciones específicas, los conjugados peptídicos de la invención se pueden usar para estimular la liberación de insulina, reducir el nivel de glucosa en sangre, reducir la motilidad gástrica, retrasar el vaciado gástrico, inhibir la absorción de alimentos, por ejemplo, por supresión del apetito, o reducir el nivel de lípidos en el plasma de un vertebrado o un mamífero. Generalmente, los compuestos de la invención se pueden usar también en el tratamiento de la diabetes mellitus asociada con el riesgo de hiperglucemia, es decir, cuando la sensibilidad a la insulina se ha reducido por estrés, infecciones del miocardio, ictus e infecciones, o en casos de resistencia a la insulina durante el embarazo. Los nuevos compuestos se pueden usar también en el tratamiento de otros tipos de diabetes, tales como los casos en que la diabetes puede ser secundaria a otras enfermedades endocrinas tales como acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, somatostatina, aldosteronismo primario, o secundaria a la administración de ciertas hormonas que causan hiperglucemia, o secundaria a ciertos fármacos (fármacos antihipertensivos, diuréticos tiazídicos, preparaciones que contienen estrógenos, fármacos psicoactivos, agentes simpaticomiméticos). Además, en líneas generales, los nuevos compuestos de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades y condiciones asociadas con el riesgo de hipoglucemia, es decir, cuando se disminuye la producción de glucosa endógena, como después de la ingestión de alcohol, o en casos en que se aumenta la sensibilidad a la insulina en pacientes con hipopituitarismo o insuficiencia corticosuprarrenal primaria, o cuando se disminuye el aclaramiento de insulina como en la insuficiencia renal progresiva.

Otros usos terapéuticos específicos se describen en los documentos WO 99/40788 (referente a los efectos inotrópico y diurético de la exendina y el GLP-1), WO 98/39022 (referente a un método de sedación de un sujeto mamífero, que tiene incrementada la activación del sistema nervioso central o periférico, que comprende la administración de exendina o GLP-1 o un agonista de exendina o GLP-1 al sujeto para producir un efecto sedativo o ansiolítico sobre el sujeto), WO 93/18786 (referente al tratamiento de la diabetes usando GLP-1(7-37) o GLP-1(7-36)amida en un régimen que comprende adicionalmente el tratamiento con un agente hipoglucémico oral, tal como sulfonilurea, que produce un fuerte efecto sinérgico), WO 98/19698 (referente al uso de análogos de GLP-1 para la regulación de la obesidad), WO 98/08531 (referente al uso de GLP-1 o análogos en un método para reducir la mortalidad y la morbilidad después de un infarto de miocardio), WO 98/08873 (referente al uso de GLP-1 o análogos en un método para atenuar los cambios catabólicos post-quirúrgicos y las respuestas hormonales al estrés). Además, los compuestos de la invención son adecuados en una terapia de combinación con otros agentes antidiabéticos, tales como insulina, metformina, sulfonilureas y tiazolidindionas, o en terapia de combinación con otros agentes antiobesidad, tales como leptina, dexfenfluramina, anfetamina, etc.

Definiciones

Un "péptido" como se usa en la presente memoria es cualquier compuesto producido por la formación de una amida entre un grupo carboxilo de un aminoácido y un grupo amino de otro. Los enlaces amida en péptidos se pueden llamar enlaces peptídicos. La palabra péptido normalmente se aplica a los compuestos cuyos enlaces amida se forman entre el C-1 de un aminoácido y el N-2 de otro (a veces llamados enlaces eupeptídicos), pero incluye compuestos con residuos unidos por otros enlaces amida (a veces llamados enlaces isopeptídicos). Los péptidos con menos de aproximadamente 10-20 residuos también se pueden llamar oligopéptidos; aquellos con más residuos, polipéptidos. Los polipéptidos de secuencia específica de más de aproximadamente 50 residuos se conocen normalmente como proteínas. Una "secuencia polipeptídica natural" como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia polipeptídica que consiste en residuos de L-aminoácidos naturales y que se puede expresar en una célula hospedante recombinante. Los compuestos X de la presente memoria son todas las secuencias peptídicas de 40 residuos de aminoácidos o menos.

"GLP-1" como se usa aquí incluye GLP-1(7-37)-OH, GLP-1(7-37)-NH₂, GLP-1(7-36)-OH, y GLP-1 (7-36)-NH₂.

"Agonista" se refiere a una sustancia endógena o a un fármaco que puede interactuar con un receptor e iniciar una respuesta fisiológica o farmacológica característica de tal receptor (contracción, relajación, secreción, activación enzimática, etc.).

"Antagonista" se refiere a un fármaco o a un compuesto que se opone a los efectos fisiológicos de otro. A nivel del receptor, es una entidad química que se opone a las respuestas asociadas al receptor normalmente inducidas por otro agente bioactivo.

"Agonista parcial" se refiere a un agonista que no puede inducir la activación máxima de una población de receptores, con independencia de la cantidad de fármaco aplicada. Un "agonista parcial" se puede calificar de "agonista con eficacia intrínseca intermedia" en un tejido dado. Más aún, un agonista parcial puede antagonizar el efecto de un agonista total que actúa sobre el mismo receptor.

"Receptor" se refiere a una molécula o a una estructura polimérica dentro de una célula o en su membrana que específicamente reconoce y se une a un compuesto que actúa como un mensajero molecular (neurotransmisor, hormona, linfoquina, lectina, fármaco, etc.).

Por "variante de exendina" de la presente invención se entiende una variante de un péptido parental de exendina que tiene al menos aproximadamente 90 % de homología con la exendina-4 y lo más preferiblemente que tiene al menos aproximadamente 95 % de homología con la exendina-4(1-39), que tiene actividad de exendina, por ejemplo, que reduce el nivel de glucosa en sangre en un mamífero y se une a un receptor de GLP-1. "Exendina-4" como se usa en la presente memoria se refiere a la exendina-4(1-39), cuya secuencia de aminoácidos se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.424.286, y a la exendina-4(1-40) como se describe por Chen & Drucker en The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 7, pp.4108-15 que difiere solamente en que tiene glicina en la posición 40 como residuo de aminoácido C-terminal. La homología de la exendina parental se determina como el grado de identidad entre dos secuencias de proteínas que indica una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La homología se puede determinar adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP, proporcionado en el paquete de programas GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, Agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), J. Mol. Biol. 48: 443-453). Se pueden utilizar las siguientes opciones para la comparación de la secuencia polipeptídica: penalización de apertura de GAP (huecos) de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.

"Sales" incluye las sales farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de adición de ácido y las sales básicas. Ejemplos de sales de adición de ácido son las sales hidrocioruro, sales de sodio, sales hidrobromuro, etc. Ejemplos de sales básicas son las sales en las que el catión se selecciona de los metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio, y los iones amonio $^+N(R^3)_3(R^4)$, en los que R³ y R⁴ designan independientemente alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquienilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son, por ejemplo, las descritas en "Remington's Pharmaceutical Science" 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y en ediciones más recientes, y en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Preparación de variantes y conjugados

Los conjugados peptídicos de la invención se pueden preparar por métodos conocidos *per se* en la técnica. Así, las variantes y las secuencias peptídicas X y Z se pueden preparar por técnicas estándar de preparación de péptidos tales como síntesis en solución o síntesis en fase sólida del tipo Merrifield. Se cree que son aplicables las estrategias de Boc (terc-butiloxicarbonilo) así como de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo).

En una estrategia posible de síntesis, los conjugados peptídicos de la invención se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida, construyendo en primer lugar la secuencia peptídica Z utilizando procedimientos estándar de

protección, acoplamiento y desprotección bien conocidos, y acoplando después secuencialmente la secuencia peptídica X sobre Z de un modo similar a la construcción de Z, y finalmente, desanclando el conjugado peptídico completo del transportador. Esta estrategia produce un conjugado peptídico, en el que la secuencia peptídica Z se une covalentemente al péptido X en la función carbonilo del C-terminal de X. Sin embargo, si el conjugado peptídico deseado es un conjugado peptídico en el que dos secuencias Z estabilizantes están covalente e independientemente unidas tanto al C-terminal como al N-terminal del péptido X, la estrategia anterior es aplicable también pero, como se entenderá por los expertos en la técnica, antes de desanclar del soporte sólido el conjugado peptídico unido por el C-terminal, es necesario acoplar secuencialmente la segunda secuencia peptídica Z al N-terminal de X de un modo similar al procedimiento descrito anteriormente. Esta estrategia se puede usar también para incorporar Z a la función carbonilo en la cadena lateral de Glu o Asp. Una posible estrategia para la preparación de conjugados peptídicos, en los que la secuencia peptídica Z se une covalentemente al átomo de nitrógeno N-terminal o se une covalentemente al átomo de nitrógeno en la cadena lateral de Lys, Arg o His de X es análoga al método descrito antes, es decir, dichos conjugados peptídicos se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida construyendo en primer lugar la secuencia peptídica X utilizando procedimientos estándar de protección, acoplamiento y desprotección bien conocidos, acoplando después secuencialmente la secuencia peptídica Z sobre X de un modo similar a la construcción de X, y finalmente, desanclando el conjugado peptídico completo del transportador. Otra posible estrategia es preparar una o las dos secuencias X y Z (o partes de ellas) separadamente mediante síntesis en solución, síntesis en fase sólida, técnicas recombinantes, o síntesis enzimática, seguida por acoplamiento de las dos secuencias mediante procedimientos bien conocidos de condensación de segmentos, ya sea en solución, o ya sea utilizando técnicas en fase sólida o una combinación de las mismas. En una realización, X se puede preparar por métodos de DNA recombinante y Z se puede preparar por síntesis en fase sólida. La conjugación de X y Z se puede llevar a cabo utilizando un enlace químico. Esta técnica permite el ensamblaje de segmentos peptídicos totalmente desprotegidos de un modo muy específico (Liu *et al.*, 1996, J. Am. Chem. Soc. 118: 307-312 y Dawson *et al.*, 1996, 226: 776). La conjugación también se puede realizar por la formación de un enlace peptídico catalizada por proteasa, lo cual ofrece una técnica muy específica para combinar segmentos peptídicos totalmente desprotegidos a través de un enlace peptídico (W. Kullmann, 1987, Enzymatic Peptide Synthesis, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 41-59).

La derivación de la cadena lateral de Lys, Arg, His, Trp, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp y Glu con la secuencia peptídica, Z, se puede llevar a cabo mediante síntesis peptídica convergente tradicional que usa esquemas de protección ortogonal adecuados conocidos en la técnica, o usando el método general, igualmente bien conocido, en fase sólida con protección ortogonal adecuada de la cadena separable.

Además, se prevé que una combinación de las estrategias mencionadas antes puede ser especialmente aplicable cuando una secuencia peptídica modificada, por ejemplo, de un péptido X que comprende enlaces isostéricos tales como enlaces peptídicos reducidos, tiene que acoplarse a una secuencia peptídica Z. En este caso, puede ser ventajoso preparar el fragmento inmovilizado de Z por acoplamientos sucesivos de aminoácidos, y después acoplar al fragmento una secuencia peptídica completa X (preparada en solución o utilizando completa o parcialmente técnicas en fase sólida o por medio de técnicas recombinantes).

Ejemplos de materiales de soporte sólido (SSM) adecuados son, por ejemplo, resinas funcionalizadas tales como poliestireno, poliácridamida, polidimetilacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, polietilenglicol injertado sobre poliestireno, látex, dynabeads, etc. Se debe comprender que puede ser necesario o deseable que el aminoácido C-terminal de la secuencia peptídica Z o el aminoácido C-terminal del péptido X se incorporen al material de soporte sólido mediante un enlazador común tal como 2,4-dimetoxi-4'-hidroxi-benzofenona, ácido 4-(4-hidroxi-metil-3-metoxifenoxi)-butírico, ácido 4-hidroxi-metilbenzoico, ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético, ácido 3-4(hidroximetilfenoxi)propiónico, y ácido p-[(R,S)-a[1-(9H-fluoren-9-il)metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacético.

Las variantes y los conjugados peptídicos de la invención se pueden desanclar del material de soporte sólido por medio de un ácido tal como ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, fluoruro de hidrógeno, etc., opcionalmente en combinación con uno o más "atrapadores" adecuados para el propósito, por ejemplo, etanoditiol, triisopropilsilano, fenol, tioanisol, etc., o el conjugado peptídico de la invención se puede desanclar del soporte sólido por medio de una base tal como amoníaco, hidrazina, un alcóxido, tal como etóxido de sodio, un hidróxido, tal como hidróxido de sodio, etc.

Así, la presente invención se refiere también a un método para la preparación de un conjugado peptídico farmacológicamente activo, en el que Z se une covalentemente a X, preferiblemente mediante un enlace peptídico. Un método para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula I (X-Z), que comprende las etapas de:

- a) acoplar un aminoácido o dipéptido que tiene grupos protectores adecuados, incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada a una secuencia peptídica inmovilizada H-Z-SSM, y de ese modo formar un fragmento peptídico N- α -protegido inmovilizado,
- b) separar dicho grupo N- α -protector, y de ese modo formar un fragmento peptídico protegido inmovilizado que tiene un extremo N-terminal desprotegido,
- c) acoplar un aminoácido o dipéptido adicional que tiene grupos protectores adecuados incluyendo un grupo N- α -

protector en la forma activada del carboxilo del N-terminal del fragmento peptídico inmovilizado, y repetir el procedimiento de las etapas de separación/acoplamiento en las etapas b) y c) hasta que se obtenga la secuencia peptídica X deseada, y después

c) desanclar el conjugado peptídico del material de soporte sólido.

5 Un método para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula II (Z-X), que comprende las etapas de:

a) acoplar un aminoácido o dipéptido que tiene grupos protectores adecuados, incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada a un material de soporte sólido (SSM), y de ese modo formar un aminoácido protegido o un dipéptido protegido inmovilizado,

10 b) separar dicho grupo N- α -protector, y de ese modo formar un fragmento aminoácido o peptídico inmovilizado que tiene un extremo N-terminal desprotegido,

c) acoplar un aminoácido o dipéptido adicional que tiene grupos protectores adecuados incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada del carboxilo del N-terminal del fragmento aminoácido o peptídico inmovilizado, y repetir el procedimiento de las etapas de separación/acoplamiento en las etapas b) y c) hasta que se obtenga la secuencia peptídica X deseada,

15 d) acoplar un aminoácido o dipéptido adicional que tiene grupos protectores adecuados incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada del carboxilo del N-terminal del fragmento peptídico inmovilizado, y repetir el procedimiento de las etapas de separación/acoplamiento en las etapas b) y c) hasta que se obtenga la secuencia peptídica Z deseada, y después

e) desanclar el conjugado peptídico del material de soporte sólido.

20 Además, un método para la preparación de un conjugado peptídico de la fórmula III (Z-X-Z), que comprende las etapas de:

a) acoplar un aminoácido o dipéptido que tiene grupos protectores adecuados, incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada del carboxilo a una secuencia peptídica inmovilizada H-Z-SSM, y de ese modo formar un fragmento peptídico N- α -protegido inmovilizado,

25 b) separar dicho grupo N- α -protector, y de ese modo formar un fragmento peptídico inmovilizado que tiene un extremo N-terminal desprotegido,

c) acoplar un aminoácido o dipéptido adicional que tiene grupos protectores adecuados, incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada del carboxilo del N-terminal del fragmento peptídico inmovilizado, y repetir el procedimiento de las etapas de separación/acoplamiento en las etapas b) y c) hasta que se obtenga la secuencia peptídica X deseada, y después

30 d) acoplar un aminoácido o dipéptido adicional que tiene grupos protectores adecuados, incluyendo un grupo N- α -protector, en la forma activada del carboxilo del N-terminal del fragmento peptídico inmovilizado, y repetir el procedimiento de las etapas de separación/acoplamiento en los pasos b) y d) hasta que se obtenga la secuencia peptídica Z deseada, y después

35 e) desanclar el conjugado peptídico del material de soporte sólido.

Las etapas de acoplamiento, separación y desanclaje se realizan mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica que toman en consideración la estrategia de protección y el material seleccionado en fase sólida. Sin embargo, en general se cree que son aplicables las estrategias de protección con Boc (terc-butiloxicarbonilo) y con Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) y que los enlaces peptídicos se pueden formar usando varios procedimientos de activación conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un derivado activado de C-terminal (haluro de ácido, anhídrido de ácido, éster activado, por ejemplo, HOBT-éster, etc.) del aminoácido o péptido apropiado con el grupo amino del aminoácido o péptido pertinente como es conocido por un experto en la química de péptidos. Además, puede ser necesario o deseable incluir grupos protectores en la cadena lateral cuando se usan residuos de aminoácidos portadores de grupos funcionales que son reactivos bajo condiciones predominantes. El esquema de protección necesario será conocido por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, M. Bodanszky and A. Bodanszky, "The Practice of Peptide Synthesis", 2.Ed, Springer-Verlag, 1994, J. Jones, "The Chemical Synthesis of Peptides", Clarendon Press, 1991, y Dryland *et al.*, 1986, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 125-137).

Los péptidos y conjugados peptídicos de la invención se pueden preparar también mediante tecnología de DNA recombinante usando métodos generales y principios conocidos por los expertos en la técnica. Una secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos y conjugados peptídicos se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de la fosfoamidita descrito por S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO Journal 3, 1984, pp. 801-805. Según el método de la fosfoamidita, se sintetizan los oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de DNA automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores adecuados. Los métodos usados para aislar o clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido X se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento del DNA genómico, la preparación del cDNA, o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención a partir del DNA genómico se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (conocida abreviadamente como PCR por sus iniciales en inglés Polymerase Chain Reaction) o la selección con anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de DNA clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*,

1990, A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (conocida abreviadamente como LCR por sus iniciales en inglés Ligase Chain Reaction LCR), la transcripción activada ligada (conocida abreviadamente como LAT por sus iniciales en inglés Ligated Activated Transcription) y la amplificación de ácidos nucleicos dependiente de la secuencia (conocida abreviadamente como NASBA por sus iniciales en inglés Nucleic Acid Sequencing-Based Amplification). A continuación, se puede ligar a una secuencia de ácido nucleico que codifica Z.

Posteriormente, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos y conjugados peptídicos se inserta en un vector de expresión recombinante que puede ser cualquier vector que se pueda someter convenientemente a procedimientos de DNA recombinante. A menudo, la selección del vector dependerá de la célula hospedante en la que se tiene que introducir. Así, el vector puede ser un vector replicante autónomo, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedante, se integra en el genoma de la célula hospedante y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado.

En el vector, la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos y conjugados peptídicos de la presente invención debe estar conectada de modo operativo a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula hospedante elegida y se puede derivar de los genes que codifican las proteínas homólogas o heterólogas con la célula hospedante. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica dichos péptidos y conjugados peptídicos en células de mamíferos son el promotor SV 40 (Subramani *et al.*, Mol. Cell Biol. 1, 1981, pp. 854-864), el promotor MT-1 (gen metalotioneína) (Palmiter *et al.*, Science 222, 1983, pp. 809-814) o el promotor tardío principal de adenovirus 2, un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (Boshart *et al.*, 1981, Cell 41: 521-530) y un promotor del virus del papiloma bovino (BPV). Un promotor adecuado para usar en células de insectos es el promotor polihedrina (Vasuvedan *et al.*, FEBS Lett. 311, 1992, pp. 7-11).

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos y los conjugados peptídicos, especialmente en una célula hospedante bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, el gen agarasa (dagA) de *Streptomyces coelicolor*, el gen levansucrase (sacB) de *Bacillus subtilis*, el gen alfa-amilasa (amyL) de *Bacillus licheniformis*, el gen amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen penicilinas (penP) de *Bacillus licheniformis*, los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, y el gen beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos y los conjugados peptídicos en una célula hospedante fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* (según se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.288.627, que se incorpora en la presente memoria como referencia), y sus híbridos. Los promotores preferidos particularmente para usar en células hospedantes fúngicas filamentosas son la TAKA amilasa, la NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes que codifican la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y los promotores glaA. En un hospedante de levadura, los promotores útiles se obtienen del gen enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, del gen galactosidasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, de los genes alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, y del gen 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células hospedantes de levaduras se describen en Romanos *et al.*, 1992, Yeast, 8: 423-488.

La secuencia de ácido nucleico que codifica dichos péptidos y conjugados peptídicos también pueden estar conectada de modo operativo a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humano (Palmiter *et al.*, op. cit.). Los terminadores preferidos para las células hospedantes fúngicas filamentosas se obtienen de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus Níger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus Níger*, y la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*. Los terminadores preferidos para las células hospedantes de levaduras se obtienen de los genes que codifican la enolasa de *Saccharomices cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células hospedantes de levaduras se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

El vector puede comprender además elementos tales como las señales de poliadenilación (por ejemplo, de SV 40 o la región Elb de adenovirus 5), secuencias activadoras de la transcripción (por ejemplo, el activador SV 40) y las

secuencias activadoras de la traducción (por ejemplo, las que codifican los VA RNAs de adenovirus). Además, las secuencias de poliadenilación preferidas para las células hospedantes fúngicas filamentosas se obtienen de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus Niger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, y la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*. Las secuencias de poliadenilación útiles para las células hospedantes de levaduras se describen en Guo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

El vector de expresión recombinante puede comprender además una secuencia de DNA que permite al vector replicarse en la célula hospedante en cuestión. Ejemplo de tal secuencia (cuando la célula hospedante es una célula de mamífero) es la SV 40 o el origen de replicación del poliovirus. Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060, y pAM β 1. Ejemplos de origen de replicación para usar en una célula hospedante de levadura son el origen de replicación de 2 micras, la combinación de CEN6 y ARS4, y la combinación de CEN3 y ARS1. El origen de replicación puede ser uno que tenga una mutación para hacer su función sensible a la temperatura en la célula hospedante (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1433).

El vector puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedante, tal como el gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, neomicina, genética, ampicilina, o hidromicina. Son marcadores adecuados para células hospedantes de levaduras ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Un marcador seleccionable para usar en una célula hospedante fúngica filamentosa se puede seleccionar del grupo que incluye, pero sin limitarse a ellas, amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa) bar (fosfotricina acetiltransferasa), hygB (hidromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa), trpC (antranilato sintasa), y los marcadores resistentes a glufosinato, así como equivalentes de otras especies. Para usar en una célula de *Aspergillus* se prefieren los marcadores amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el marcador bar de *Streptomyces hygroscopicus*. Además, la selección se puede llevar a cabo por cotransformación, por ejemplo, según se describe en el documento WO 91/17243, donde el marcador seleccionable está en un vector diferente.

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos y los conjugados peptídicos, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, op. cit.).

La célula hospedante en la que se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula que sea capaz de producir los péptidos y los conjugados peptídicos y puede ser una célula eucariota, tal como las células de invertebrados (insectos) o las células de vertebrados, por ejemplo, oocitos de *Xenopus laevis* o células de mamíferos, en particular células de insectos y mamíferos. Ejemplos de líneas celulares adecuadas de mamíferos son las líneas celulares COS (por ejemplo, ATCC CRL 1650), BHK (por ejemplo, ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10) o CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61).

Los métodos para transfectar células de mamíferos y expresar secuencias de DNA introducidas en las células están descritos, por ejemplo, en Kaufman and Sharp, 1982, J. Mol. Biol. 159: 601-621; Southern and Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341; Loyer *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 422-426; Wigler *et al.*, 1978, Cell 14: 725; Corsaro and Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7: 603; Graham and van der Eb, 1973, Virology 52: 456; Fraley *et al.*, 1980, JBC 225: 10431; Capecchi, 1980, Cell 22: 479; Wiberg *et al.*, 1983, NAR 11: 7287; and Neumann *et al.*, 1982, EMBO J. 1: 841-845. La célula hospedante también puede ser un patógeno unicelular, por ejemplo, un procarionte, o un patógeno no-unicelular, por ejemplo, un eucariota. Las células unicelulares útiles son células bacterianas tales como las bacterias gram positivas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En una realización preferida, la célula hospedante bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. La transformación de una célula hospedante bacteriana se puede efectuar, por ejemplo, mediante transformación por protoplasto (véase, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), utilizando células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnar and Davidoff Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278). La célula hospedante puede ser una célula fúngica. La célula hospedante fúngica puede ser también una célula de levaduras. El término "levadura" como se usa en la presente memoria incluye levaduras ascoesporógenas (Endomycetales), levaduras basidioesporógenas, y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (Blastomycetes).

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar células de mamíferos, tal como un medio que contenga suero o un medio libre de suero que contenga suplementos apropiados, o un medio adecuado para cultivar células de insectos, levaduras o fúngicas. Los medios adecuados están

disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según las fórmulas publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection).

Así, la invención se refiere también a un método para producir los conjugados peptídicos de la invención que tienen una secuencia polipeptídica natural, que comprende

- 5 a) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia peptídica del conjugado peptídico de la invención y un marcador seleccionable contenido en una construcción de ácido nucleico o un vector dentro de una célula hospedante para obtener una célula hospedante recombinante;
- b) seleccionar dicha célula hospedante recombinante;
- c) cultivar dichas células hospedantes recombinantes en condiciones que permiten la producción de dicha secuencia polipeptídica;
- 10 d) aislar dicha secuencia polipeptídica del cultivo; y
- e) desanclar opcionalmente dicha secuencia polipeptídica utilizando una proteasa apropiada para obtener dicho conjugado peptídico.

Las variantes y conjugados peptídicos de la invención que tienen una secuencia polipeptídica natural producidos de este modo por las células, se pueden recuperar posteriormente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen separar las células hospedantes del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteicos del sobrenadante o del filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificar por varios procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares. El sustituyente o sustituyentes lipófilos se pueden incorporar al péptido de la presente invención usando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, el sustituyente lipófilo se puede introducir incorporando un aminoácido con el sustituyente lipófilo ya incorporado en el método de síntesis estándar (véase, por ejemplo, la síntesis del compuesto 7 en la sección de Ejemplos). Alternativamente, el sustituyente se puede incorporar después de que el péptido haya sido sintetizado y aislado como, por ejemplo, se describe en el documento WO98/08871.

25 La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos en los que algunos de los compuestos se proporcionan a modo de comparación con los conjugados peptídicos de la presente invención.

Ejemplos

Síntesis peptídica, procedimientos generales

• Aparato y estrategia sintética

30 Los péptidos se sintetizan en modo de lotes en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) como el grupo protector de N- α -amino y los grupos protectores comunes adecuados para las funcionalidades de la cadena lateral (Dryland *et al.*, 1986, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 125-137).

• Disolventes

35 El disolvente DMF (*N,N*-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemania) se purifica haciéndolo pasar a través de una columna rellena con una resina fuerte intercambiadora de cationes (ácido fuerte Lewatit S 100 MB/H, Bayer AG Leverkusen, Alemania) y se analizan, antes de usar, en cuanto a las aminas libres mediante adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) que da lugar a un color amarillo (Dhbt-O-anión) si están presentes aminas libres. El disolvente DCM (diclorometano, grado analítico, Riedel de-Häen, Alemania) se usa directamente sin purificación. El THF (tetrahidrofurano, grado analítico, Riedel de-Häen, Alemania) se usa directamente sin purificación adicional.

• Aminoácidos

45 Los aminoácidos protegidos por Fmoc se adquieren de MilliGen (Reino Unido) y de PerSeptive Biosystems GmbH Hamburgo, Alemania en formas adecuadas con la cadena lateral protegida. El FmocLys(palmitoil)-OH se adquiere de Bachem (Suiza).

• Enlazador

El ácido (4-hidroximetilfenoxi)acético (HMPA), Novabiochem, Suiza se acopla a la resina como un éster de 1-hidroxibenzotriazol (HObt) preformado, o generado *in situ* por medio de DIC.

• Reactivos de acoplamiento

50 El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquiere de (Riedel de Häen, Alemania) y se destila antes de usar, la diciohexilcarbodiimida (DCC) se adquiere de Merck-Schuchardt, München, Alemania, y se purifica por destilación.

- Soportes sólidos

Los péptidos sintetizados según la estrategia de Fmoc se sintetizan sobre los siguientes tipos de soportes sólidos utilizando una concentración 0,05 M o concentraciones más altas de aminoácidos activados protegidos por Fmoc, en DMF. Resinas TentaGel S 0,22-0,31 mmol/g (TentaGel S-Ram, TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc; Rapp Polymere, Alemania).

- Catalizadores y otros reactivos

La diisopropiletilamina (DIEA) se adquiere de Aldrich, Alemania, y la etilendiamina de Fluka, la piperidina y la piridina de Riedel-de Hën, Frankfurt, Alemania. La 4-(N,N-di-metilamino)piridina (DMAP) se adquiere de Fluka, Suiza y se usa como un catalizador en reacciones de acoplamiento que involucran anhídridos simétricos. El etanoditiol se adquiere de Riedel-de Hën, Frankfurt, Alemania. La 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) y el 1-hidroxibenzotriazol (HObt) se obtienen de Fluka, Suiza.

- Procedimientos de acoplamiento

El primer aminoácido se acopla como un anhídrido simétrico en DMF generado a partir del aminoácido N- α -protegido apropiado por medio de DIC o DCC. Los siguientes aminoácidos se acoplan como ésteres de HObt preformados preparados a partir de aminoácidos N- α -protegidos y HObt mediante DIC en DMF. Las acilaciones se comprueban por el ensayo de la ninhidrina realizado a 80 °C para evitar la desprotección del Fmoc durante el ensayo (Larsen, B. D. and Holm, A., 1994, Int. J. Peptide Protein Res. 43: 1-9).

- Acoplamiento como éster de HObt

Método a. Se disuelven 3 equivalentes de aminoácido N- α -amino protegido en DMF junto con 3 equivalentes de HObt y 3 equivalentes de DIC. Se deja la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se añade a la resina, que se habrá lavado con una solución de Dhbt-OH al 0,2 % en DMF antes de la adición del aminoácido preactivado.

Método b. Se disuelven 3 equivalentes de aminoácido N- α -amino protegido en DMF junto con 3 equivalentes de HObt. Se añaden 3 equivalentes de DIC justo antes de usar. La solución final se añade a la resina.

- Anhídrido simétrico preformado

Se disuelven 6 equivalentes de aminoácido N- α -amino protegido en DCM y se enfrían a 0 °C. Se añade DCC o DIC (3 equivalentes) y la reacción se continúa durante 10 minutos. Se separa el disolvente a vacío y se disuelve el residuo en DMF. En caso de usar DCC la solución de DMF se filtra y se añade inmediatamente a la resina seguida de 0,1 equivalentes de DMAP.

- Desprotección del grupo N- α -amino-protector, Fmoc

La desprotección del grupo Fmoc se realiza por tratamiento con piperidina al 20 % en DMF (1 x 5 y 1 x 10 min), seguido por lavado con DMF hasta que no se pueda detectar el color amarillo (Dhbt-O-) después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada.

- Desanclaje del péptido de la resina con ácido

Método a. Los péptidos se desanclan de las resinas mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA, Riedel-de Hën, Frankfurt, Alemania) en agua al 95 % v/v o con TFA al 95 % y etanoditiol al 5 % v/v a temperatura ambiente durante 2 horas. Las resinas filtradas se lavan con TFA al 95 %-agua y los filtrados y lavados se diluyen añadiendo ácido acético al 10 %. La mezcla resultante se extrae 3 veces con éter y finalmente se liofiliza. El producto crudo liofilizado se analiza por cromatografía de líquidos de alta resolución (conocida abreviadamente como HPLC por sus iniciales en inglés High Performance Liquid Chromatography) y se identifica por espectroscopia de masas (MS).

- Síntesis peptídica en modo de lotes en resinas TentaGel S-RAM

Se coloca la resina TentaGel S-RAM (100-1000 mg, 0,22-0,31 mmol/g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración. La resina se hincha en DMF (5-10 mL), y el grupo Fmoc se separa según el procedimiento descrito antes. Los siguientes aminoácidos según la secuencia se acoplan como ésteres de HObt protegidos por Fmoc (3 equivalentes) generados *in situ* mediante DIC como se ha descrito antes. Se continúan los acoplamientos durante 3 h, a menos que se especifique otra cosa. Se drena la resina y se lava con DMF (4 x 5-10 mL, 2 min cada vez) para separar el reactivo en exceso. Todas las acilaciones se comprueban mediante el ensayo de la ninhidrina realizado a 80 °C. Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5-10 mL, 5 min cada vez), DCM (3 x 5-10 mL, 1 min cada vez) y finalmente con éter dietílico (3 x 5-10 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío.

- Condiciones de HPLC

El análisis por HPLC isocrática se realiza en un sistema Shimadzu que consiste en una bomba LC-6A, un detector de UV MERCK HITACHI L-4000 operado a 215 nm y una válvula de inyección Rheodyne 7125 con un bucle de 20 μ L. La columna usada para el análisis isocrático es una Spherisorb ODS-2 (100 x 3 mm; partículas de 5 μ m) (Microlab, Aarhus, Dinamarca). El análisis por HPLC utilizando gradientes se realiza en una bomba MERCK-HITACHI L-6200 Intelligent, en un detector UV MERCK HITACHI L-4000 a 215 nm y en una válvula de inyección Rheodyne 7125 con un bucle de 20 μ L, o en un instrumento Waters 600 E equipado con un detector de fotodiodos en serie Waters 996. Las columnas usadas son una Rescorce™ RPC de 1 mL (Waters) o una LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) (Merck).

- 5 El tampón A es TFA al 0,1 %, en volumen, en agua y el tampón B es 90 % de acetonitrilo, en volumen, 9,9 % de agua en volumen, y 0,1 % de TFA en volumen. Los tampones se bombean a través de las columnas a un caudal de 1,3-1,5 mL/min utilizando cualquiera de los siguientes gradientes para el análisis peptídico 1) gradiente lineal de 0 % - 100 % de B (30 min) o 2) 0 % de B (2 min), gradiente lineal de 0 - 50 % de B (23 min), 50 - 100 % de B (5 min).

- 15 Para HPLC preparativa, la purificación se realiza en un instrumento Waters 600 E equipado con un detector de fotodiodos en serie Waters 996. La columna utilizada es Waters Delta-Pak C-18 15 μ m, 100 Å, 25 x 100 mm. El gradiente "2" se usa con un caudal de 9 mL/min.

- Espectroscopia de masas

- 20 El espectro de masas se obtiene en un instrumento Finnigan Mat LCQ equipado con una sonda de electronebulización (ESI) (ES-MS) y en un instrumento ToFSpec E, Fisons (MALDI-TOF) utilizando ácido β -ciano-*p*-hidroxycinámico como matriz. Alternativamente, el espectro se puede obtener por un instrumento Micromass LCT.

Síntesis peptídica de los péptidos de la técnica anterior

(i) Síntesis peptídica del Compuesto (i). H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH₂ (exendina-4(1-39)-NH₂) en TentaGel S-RAM.

- 25 Se coloca la resina TentaGel S-RAM seca (0,25 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc según el procedimiento descrito antes, y el péptido de acuerdo con la secuencia se ensambla como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en resinas TentaGel S-RAM". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El péptido crudo se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 90 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 17 %.

- 35 (ii) Síntesis peptídica del Compuesto (ii). H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-NH₂ (des Ser³⁹ exendina-4(1-39)-NH₂) en TentaGel S-RAM.

- 40 Se coloca la resina TentaGel S-RAM seca (0,25 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc según el procedimiento descrito antes, y el péptido de acuerdo con la secuencia se ensambla como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en resinas TentaGel S-RAM". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El péptido crudo se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 97 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 22 %.

(iii) Síntesis peptídica del Compuesto (iii). H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂ (Gly⁸-GLP1-(7-36)Humano)-NH₂ en TentaGel S-RAM.

- 50 Se coloca la resina TentaGel S-RAM seca (0,25 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc según el procedimiento descrito antes, y el péptido de acuerdo con la secuencia se ensambla como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en resinas TentaGel S-RAM". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El péptido crudo se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El

producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 95 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 9 %.

Síntesis de las secuencias peptídicas de la invención

4. Síntesis peptídica del Compuesto 4, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Lys)₆-NH₂ (Gly⁸-GLP1-(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 95 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 11,7 %.

4a. Síntesis peptídica del Compuesto 4, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ ([Gly⁸]hGLP1-(7-36)-(Lys)₆-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 90 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 13 %.

5. Síntesis peptídica del Compuesto 5, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-(palmitoil)-(Lys)₆-NH₂ ([Gly⁸, Lys³⁷(palmitoil)]GLP1-(7-36)(Humano)-(Lys)₇-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". El reactivo Fmoc-Lys(palmitoil)-OH se acopla de una manera ligeramente modificada debido a su pobre solubilidad en DMF. Se disuelven aproximadamente 400 mg de Fmoc-Lys(palmitoil)-OH en aproximadamente 6 mL de THF en lugar de DMF. Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 95 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 9,3 %.

6. Síntesis peptídica del Compuesto 6, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys(palmitoil)-Gly-Arg-(Lys)₆-NH₂ ([Gly⁸, Lys³⁴(palmitoil)]GLP1-(7-36)(Humano)-(Lys)₆-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". El reactivo Fmoc-Lys(palmitoil)-OH se acopla de una manera ligeramente modificada debido a su pobre solubilidad en DMF. Se disuelven aproximadamente 400 mg de Fmoc-Lys(palmitoil)-OH en aproximadamente 6 mL de THF en lugar de DMF. Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 90 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 4,2 %.

7. Síntesis peptídica del Compuesto 7, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(palmitoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Ars-(Lys)₆-NH₂

5 ([Gly⁸, Lys²⁶(palmitoil)]GLP1-(7-36)(Humano)-(Lys)₆-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". El reactivo Fmoc-Lys(palmitoil)-OH se acopla de una manera ligeramente modificada debido a su pobre solubilidad en DMF. Se disuelven aproximadamente 400 mg de Fmoc-Lys(palmitoil)-OH en aproximadamente 6 mL de THF en lugar de DMF. Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 90 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 2,2 %.

10. Síntesis peptídica del Compuesto 10. H-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ (H-(Lys)₆-[Gly⁸]hGLP-1(7-36)-(Lys)₆-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 90 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 18 %.

11. Síntesis peptídica del Compuesto 11, H-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂ (H-(Lys)₆-[Gly⁸]hGLP-1(7-36)-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 98 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 15 %.

12. Síntesis peptídica del Compuesto 12, H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ ([Gly⁸]hGLP-1(7-36)-(Lys)_x-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 98 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 4,2 %.

13. Síntesis peptídica del Compuesto 13. H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ ([Gly⁸]hGLP-1(7-36)-(Lys)₁₀-NH₂) en TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc.

Se coloca la resina TentaGel S-RAM-Lys(Boc)Fmoc seca (0,22 mmol/g, 1000 mg) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración y se hincha durante dos horas en DMF (5 mL). Se separa el grupo Fmoc de la primera lisina como se ha descrito antes y se continúa la síntesis hasta finalizar la secuencia peptídica como se describe en "Síntesis peptídica en modo de lotes en TentaGel S-Ram-Lys(Boc)Fmoc". Una vez que ha finalizado la síntesis, se lava la peptidil-resina con DMF (3 x 5 mL, 1 min cada vez), DCM (3 x 5 mL, 1 min cada vez), éter dietílico (3 x 5 mL, 1 min cada vez) y se seca a vacío. Se desancla el péptido de la resina según el *método a* descrito antes y se liofiliza con ácido acético. El producto crudo liofilizado se purifica por HPLC preparativa

utilizando el procedimiento descrito antes. El producto purificado resulta ser homogéneo y la pureza resulta ser superior al 95 %. La identidad del péptido se confirma mediante ES-MS. Rendimiento 2 %.

20. Preparación recombinante del Compuesto 2

Construcción del vector de expresión pYES0010

- 5 Se construyó un cDNA sintético para expresión heteróloga en levaduras. Se tradujo a la inversa la secuencia de proteína que codifica el Compuesto 2 utilizando una tabla de uso de codones de *Saccharomyces cerevisiae* (Base de datos del Genoma de *Saccharomyces*). Para permitir la traducción del cDNA sintético se añadió un codón de inicio ATG adicional al extremo 5' y se añadió un codón de paro TAA al extremo 3'. La construcción se insertó en HindIII y en el sitio EcoRI del vector lanzadera pYES2 que comprende un gen resistente a la ampicilina, y la nueva construcción se denominó pYES0010, véase la Fig. 6. A continuación, se transformó *E. coli* con pYES0010 y se sometió a presión de selección por ampicilina. Se seleccionaron y secuenciaron los clones positivos.

Transformación en levaduras

- 15 Para transformar las levaduras haploides INVSc1: MATa his3delta1 leu2 trp1-289 ura3-52 con pYES0010 se cultivaron las levaduras en medio YPD (extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, glucosa al 2 %, sulfato de adenina al 0,004 %) a 30 °C hasta saturación. Se cosechó 1 mL de cultivo para las transformaciones. Se añadieron 2 µL de 10 mg/mL de DNA portador y 1 µg de pYES0010 y se mezclaron. Se añadieron 0,5 mL de (PEG 4000 al 45 %, Li OAc 1 M, EDTA 0,5 M y Tris-HCl 1 M) (pH 7,5) y se mezclaron. Finalmente, se añadieron 20 µL de DTT 1 M y se incubó la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se expusieron las células a un choque de calor a 42 °C durante 10 minutos y se distribuyeron en placas selectivas (base nitrogenada de levadura al 6,7 %, glucosa al 2 %, adenina 20 µg/mL, arginina 20 µg/mL, isoleucina 29 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 60 µg/mL, lisina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, metionina 20 µg/mL, fenilalanina 50 µg/mL, valina 150 µg/mL, tirosina 30 µg/mL y agar al 2,5 %. Se incubaron las placas a 30 °C durante 3 a 5 días hasta que aparecieron los transformantes.

Expresión y purificación del Compuesto 2

- 25 Se cultivaron los transformantes en medios selectivos (base nitrogenada de levadura al 6,7 %, glucosa al 2 %, adenina 20 µg/mL, arginina 20 µg/mL, isoleucina 29 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 60 µg/mL, lisina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, metionina 20 µg/mL, fenilalanina 50 µg/mL, valina 150 µg/mL, tirosina 30 µg/mL) durante 1,5 días. Se cosecharon y se resuspendieron las células en medio de inducción de galactosa (base nitrogenada de levadura al 6,7 %, galactosa al 4 %, adenina 20 µg/mL, arginina 20 µg/mL, isoleucina 29 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 60 µg/mL, lisina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, metionina 20 µg/mL, fenilalanina 50 µg/mL, valina 150 µg/mL, tirosina 30 µg/mL) durante 1 día. Se cosecharon y homogenizaron las células en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 que contenía inhibidores de la proteasa (Roche). Se aclaró el lisado por centrifugación a 20.000 X g durante 30 min. Se cargó el sobrenadante en una columna de Superdex 12 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,5. La columna se eluyó en tampón de bicarbonato amónico 50 mM de pH 8,0. Se agruparon las muestras que contenían el Compuesto 2 recombinante. Se separó la metionina N-terminal mediante metionina aminopeptidasa y se purificaron después las muestras en una columna de HPLC.

Condiciones de HPLC para la purificación del Compuesto 2

- 40 Columna de HPLC: Kromasil RP C8; K 100-10-C8 nr. CER 2230. compuesto
Temperatura: 22 °C
Caudal: 35 mL/min
Disolventes para HPLC:
A: ácido trifluoroacético al 0,10 % en agua
B: ácido trifluoroacético al 0,10 % en acetonitrilo:agua 90:10.

- 45 Se eluyó el Compuesto 2 de la columna de HPLC con ácido trifluoroacético al 0,10 % en 20 % a 80 % de acetonitrilo durante 40 min.

21. Formulaciones inyectables de péptido

- 50 Las formulaciones de dosis fija de péptido para inyección intravenosa se preparan disolviendo el péptido en una solución salina, estéril e isotónica, y almacenando la solución resultante en ampollas de vidrio rellenas con gas inerte bajo condiciones estériles. Cada dosis del péptido se conserva seca en ampollas o viales tapados rellenos con gas inerte. Las formulaciones de multidosis de péptido para inyección intravenosa se preparan disolviendo el péptido en una solución salina, estéril e isotónica, y almacenando la solución que resulta en viales tapados, añadiendo conservante (por ejemplo, parahidroxibenzoato al 0,1 %, alcohol bencílico al 1 % o clorocresol al 0,1 %) si es necesario.

Ejemplo de formulación multidosis de péptido:

	Compuesto 2	12,25 mg
	Dihidrogenofosfato de sodio	1,380 g
	Parahidroxibenzoato	0,1 g
5	Agua para inyectables	100 mL

22. Experimentos de estabilidad

Los estudios de estabilidad *in vitro* con los presentes péptidos y conjugados peptídicos en presencia de enzimas proteolíticas seleccionadas se aplican como una herramienta para evaluar la protección de dichos péptidos frente a la proteólisis *in vivo*. El objetivo de los experimentos realizados fue medir y comparar la estabilidad *in vitro* de los compuestos 4, 5, 6 y 7 con la de los compuestos de la técnica anterior, Compuesto (iii) H-(Gly⁸)-hGLP-1(7-36)-NH₂, y hGLP-1(7-36)-NH₂ en soluciones de una o más de las enzimas leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y dipeptidil aminopeptidasa IV a 37 °C.

Materiales y aparatos para estudios de estabilidad *in vitro*

Se utilizó agua de la más alta calidad obtenida de un sistema de tratamiento de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El acetonitrilo (ACN) era de calidad super-gradiente obtenido de Labscan Ltd. (Dublin, Ireland). El ácido trifluoroacético (TFA) era del 99,9 %, el dihidrogenofosfato de sodio (NaH₂PO₄), el hidróxido de sodio (NaOH) y todos los demás compuestos químicos usados eran de grado analítico. La leucina aminopeptidasa (EC 3.4.11.1), la carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1) y la dipeptidil peptidasa (Dipeptidil aminopeptidasa IV, EC 3.4.14.5) se obtuvieron todas de Sigma (St. Louis, Mo. USA). El análisis por HPLC con gradiente se realizó en un sistema de HPLC Hewlett Packard HP 1100 que consiste en una bomba binaria HP 1100, un automuestreador HP 1100, un termostato de columna HP 1100 y un detector de longitud de onda variable HP 1100. Se utilizó Hewlett Packard Chemstation para el software de LC (cromatografía de líquidos) (Rev. A.06.01) para el control del instrumento y adquisición de los datos. Se utilizó con el instrumento una columna Vydac 238TP54 (150 x 4,6 mm I.D.) rellena con partículas de 300 Å, C18, 5 µm. Se utilizó un calentador de bloque SHT200D de Stuart Scientific para calentar las soluciones de péptido/enzima durante los experimentos de estabilidad. Se estudió la degradación de los compuestos de ensayo a 37 °C en soluciones tampón de fosfato 50 mM de pH 7,4 que contenían leucina aminopeptidasa (25 U/ml) o carboxipeptidasa A (1 U/ml) o tampón de bicarbonato de amonio 100 mM de pH 8,0 que contenía dipeptidil aminopeptidasa IV (0,5 U/ml). Se iniciaron los experimentos por la adición de una alícuota (100 µL) de una solución stock (1 mg/ml) del péptido en agua a 900 µL de solución de enzima precalentada en un microvial de Eppendorf dando una concentración inicial de 0,1 mg/ml (1,7 - 10⁻⁵ - 1,8 - 10⁻⁵ M) del péptido. La solución de péptido/enzima se mantuvo a 37 °C y a intervalos de tiempo apropiados se sacaron muestras de 100 µL de la solución de péptido/enzima y se mezclaron cuidadosamente con 20 µL de TFA al 25 % en acetonitrilo con el fin de parar el proceso de degradación enzimática. Las muestras inactivadas se transfirieron a los viales del automuestreador y se analizaron en cuanto al contenido de compuesto de ensayo intacto por HPLC como se describe más adelante. Se calcularon las semividas (t_{1/2}) para los compuestos de ensayo en las soluciones de enzima a partir de la representación gráfica de los logaritmos naturales de la concentración residual (esto es, las alturas de los picos de HPLC) frente al tiempo, utilizando la fórmula:

$$t_{1/2} = 1/k_{\text{obs}} \cdot \ln(2), \text{ donde } k_{\text{obs}} \text{ es la constante aparente de primer orden para la degradación observada.}$$

Análisis por HPLC

Las muestras de los experimentos de estabilidad realizados como se ha descrito anteriormente, se analizaron mediante análisis por HPLC con gradiente utilizando la instrumentación descrita antes y las siguientes condiciones experimentales.

Temperatura de la columna:	30 °C
Volumen de inyección:	10 µL
Fase móvil A:	TFA al 0,1 % en agua
Fase móvil B:	TFA al 0,085 % en acetonitrilo (ACN)
Gradiente:	32-52 % de B en 21 min
Detección:	UV a 215 nm

Los resultados experimentales obtenidos de los experimentos de estabilidad individuales se presentan en la Tabla 1 que sigue. Se ve en la tabla que la semivida de los compuestos de la invención se alarga considerablemente en solución con todas las enzimas ensayadas.

Tabla 1

Compuesto de ensayo		Solución de enzima		Semivida (t _{1/2})
Compuesto No.	Nombre	Enzima	Conc.	
Compuesto 5	H-(Gly ⁸)-hGLP-1(7-36)-Lys(Palm)-Lys ₆ -NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	> 3 días > 2 días 440 min
Compuesto 7	H-(Gly ⁸ ,Lys ²⁶ (Palm))-HGLF-1(7-36)-Lys ₆ -NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	1150 min 1058 min 526 min
Compuesto 6	H-(Gly ⁸ ,Lys ³⁴ (Palm))-H-(Gly ⁸ ,Lys ³⁴ (Palm))-hGLP-1(7-36)-Lys ₆ -NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	1,5 días >1 día 177 min
GLP-1	H-hGLP-1(7-36)-NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	152 min 48 min 2,0 min
Compuesto 4	H-(Gly ⁸)-hGLP-1(7-36)-Lys ₆ -NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	1,5 días 145 min 292 min
Compuesto (iii)	H-(Gly ⁸)-hGLP-1(7-36)-NH ₂ NH ₂	LAP CPA DPP IV	25 U/ml 1 U/ml 0,5 U/ml	693 min 127 min 56 min

LAP: Leucina aminopeptidasa, CPA: Carboxipeptidasa A. DPP IV: Dipeptidil aminopeptidasa IV

23. Estudios de estabilidad *in vitro* del Compuesto (iii) y del Compuesto 4 en plasma de rata

- 5 Se hizo seguimiento de la degradación de los dos compuestos de ensayo en plasmas de ratas (Sprague-Dawley) estabilizados con heparina mediante la combinación de los métodos de extracción en fase sólida y LC-MS (cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas). Se siguió la degradación durante 720 minutos en el plasma. Se encontró que la semivida del Compuesto (iii) era de 238 min en el plasma de rata. Se comparó este valor con el de la semivida del Compuesto 4, que se encontró que era de 466 min en el plasma de rata.

Materiales y métodos

- 10 Se obtuvieron plasmas blancos de rata en heparina sódica (5000 unidades/mL) de Harlan Sera Lab Ltd. (Loughborough, UK). Sustancias de ensayo y soluciones. Las sustancias de ensayo usadas en el estudio se listan en la tabla que sigue. Para los experimentos *in vitro* se utilizó una solución stock de 100 µg/ml de agua milli-Q (que corresponde al Compuesto (iii) H-(Gly⁸)-GLP-1-NH₂ 26,0 µM o al Compuesto 4 17,8 µM).

Nombre de la sustancia	Lote N°	Peso molecular (Mw) medio	Contenido en péptido
Compuesto (iii)	ZP 7,73-1F	3284 g/mol	85 %
Compuesto 4	ZP 7,69-1C	4053 g/mol	72 %

- 15 El análisis por LC-MS se realizó en un instrumento HP 1100 constituido por un desgasificador en línea, una bomba de gradiente cuaternario, un automuestreador, una estufa para la columna, de Hewlett Packard (Wilmington, DE, USA) en combinación con un espectrómetro de masas Quattro Ultima de Micromass (Altrincham, UK). Las dos operaciones, LC y MS se controlaron por el software MassLynx 3.3. Las separaciones por LC previas a la detección por MS se realizaron en una columna Vydac 218MS52 (2,1 x 250 mm) (Hesperia, CA, USA). El volumen inicial de plasma fue 1000 µL (37 °C). A partir del volumen inicial de plasma, se transfirieron 100 µL a un vial de HPLC de 0,75 mL (usado como blanco), se mezclaron con 560 µL de solución de extracción (acetonitrilo (MeCN):carbonato de amonio 0,18 M de pH 9,5 (6:94 v/v), 4 °C) y se extrajeron por extracción en fase sólida utilizando el Robot ASPEC XL4. Se añadió un volumen de 100 µL de la solución stock a los 900 µL de plasma restantes, se mezclaron

5 cuidadosamente y se incubaron a 37 °C (correspondiendo a una concentración inicial de 10 µg de los compuestos de ensayo/ml). En cada punto de tiempo (0,2, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 662 y 720 min., respectivamente) se recogieron 100 µL de plasma que contenía el fármaco, se mezclaron con 560 µL de solución de extracción enfriada en hielo e inmediatamente se extrajeron por SPE (extracción en fase sólida) como se ha descrito antes. Se analizaron por LC-MS las muestras de plasma extraídas. Los análisis por LC-MS se realizaron en un LC HP 1100 series en combinación con un instrumento MS Quattro Ultima 11 de triple cuadrupolo. Se mantuvieron las muestras a 18 °C en la bandeja del automuestreador antes de la inyección de 10 µL. Se realizaron las separaciones a 30 °C en una columna LC Vydac 218MS52 (2,1 x 250 mm) utilizando un gradiente lineal de 15 a 50 % de B en 14 min, a un caudal de 250 µL/min, se utilizó ácido fórmico al 0,1 % en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1 % en MeCN como fase móvil B. Se detectaron el Compuesto 4 y el Compuesto (iii) por registro de ion único (SIR, por sus iniciales en inglés Single Ion Recording) utilizando los iones 6 H⁺ (m/z = 676.7) y 4 H⁺ (m/z = 822.1), respectivamente. El voltaje de cono para el análisis del Compuesto (iii) y del Compuesto 4 se fijó en 100 y 70 V, respectivamente. La estabilidad *in vitro* del Compuesto (iii) y del Compuesto 4 ha sido investigada en plasma de rata por LC-MS. Se hizo seguimiento de la degradación de los dos compuestos durante 720 min, y los resultados se llevaron a un gráfico representando el logaritmo natural de las áreas de los picos frente al tiempo. Se encontraron las velocidades de degradación (k_{obs}) de los compuestos como la pendiente de una línea de regresión lineal, y se encontró la semivida ($T_{1/2}$) como $\ln 2/k_{obs}$. Los resultados del experimento se listan a continuación.

Estudio de degradación a lo largo de 720 minutos en plasma de rata

Compuesto	$T_{1/2}$ (min)	k_{obs} (min ⁻¹)	r^2
Compuesto (iii)	238,4	0,0029	0,9785
Compuesto 4	466,1	0,0015	0,8596

20 La conclusión del experimento es por tanto que la conjugación de un péptido con Lys₆ en C-terminal con la secuencia (Gly⁸)hGLP-1(7-36) da como resultado una estabilidad en plasma de rata aumentada al doble.

24. Efecto de la administración de dosis única por vía oral y parenteral del Compuesto 5 sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones ob/ob diabéticos.

25 Los compuestos de la invención poseen propiedades para reducir la glucosa en sangre. Esto se examinó utilizando el Compuesto 5 para evaluar el efecto sobre los niveles de glucosa en sangre (BG) en los ratones mutantes ob/ob después de la administración intraperitoneal (i.p.) y oral (p.o.). El Compuesto 5 redujo los niveles de glucosa en sangre en los ratones diabéticos a una dosis de 110 µg/ratón cuando se administró i.p. Asimismo la administración p.o. del Compuesto 5 provocó una reducción similar en los niveles de glucosa en sangre a una dosis de 1100 µg/ratón, pero no a dosis más bajas.

Parte Experimental

30 Se pusieron en jaulas (3 ratones/jaula) cuarenta ratones ob/ob diabéticos hembras (cepa Umeå, Bomholtgaard), que son obesos debido a una leptina mutante dominante (Tomita, T., Doull, V., Pollock, H.G., and Krizsan, D. 1992. Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). *Pancreas* 7: 367-75) en condiciones ambientales controladas siguiendo un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 h y se alimentaron con dieta estándar Altromin n° 1324 con libre acceso al agua del grifo. A su llegada, los animales tenían 8 semanas de edad. Se dejaron los ratones 2 semanas de aclimatación antes de que se iniciaran los experimentos. En el momento del experimento los ratones tenían 13 semanas de edad con un peso corporal de 41,8 ± 3,2 g (media ± desviación estándar (SD); n=42). La manipulación de los ratones se realizó uno y tres días antes del experimento con el fin de reducir las desviaciones de la glucosa en sangre inducidas por el estrés. El día del experimento, se tomó sangre de la punta de la cola 2-3 horas después de encender la luz. Se vertió una única gota de sangre (<5 µL) sobre una tira de glucosa para el análisis y se midió mediante un equipo Elite Autoanalyzer, Bayer, Dinamarca. Se analizó la concentración total de glucosa en sangre (BG) por el método de la glucosa oxidasa inmovilizada. Los niveles de glucosa en sangre variaron entre normoglucemia e hiperglucemia severa (intervalo: 3,6-15,6 mM; media ± SD: 9,4 ± 3,3 mM; n=42). Se excluyeron del estudio seis animales con BG < 5,8 mM (total n=36). Los restantes animales fueron distribuidos basándose en sus niveles de BG para asegurar que la media de BG fuera similar entre los grupos. Una hora después de tomar la muestra control inicial de sangre, se administraron los fármacos y se midió la BG a t=60 min, t=120 min, t=240 min, t=480 min.

Péptidos y otros materiales

50 Se sintetizó el Compuesto 5 (lote n° ZP 3.12 fracción 1 - 2. Purificación) por el Departamento de Química, Zealand Pharmaceuticals. Se disolvió el péptido en NaCl isotónico estéril poco antes de la administración y se administró en un volumen de 0,2 mL. Se usaron las mismas soluciones tanto para administración p.o. como para la i.p. Para cada animal se rellenó una hoja de registro de datos en el momento de cada toma de muestra de sangre.

Administración del fármaco

Se administró a los animales el Compuesto 5, y la dosis máxima fue de 1100 µg/ratón y la dosis más baja fue de 1,1 µg/ratón. Como control negativo, se administró solución salina p.o. y como control positivo se administró el compuesto de ensayo i.p. en una dosis de 110 µg/ratón.

- 5 Durante las condiciones de control, los niveles de glucosa en sangre de los ratones ob/ob que no estaban en ayunas fueron similares en todos los grupos (no se muestran los datos individuales de cada grupo), pero dentro de los grupos, hubo una gran dispersión en los niveles de BG (intervalo de BG para todos los animales: 5,8-15,6 mM). Por lo tanto, para corregir el grado variable de hiperglucemia, los resultados se expresan como la diferencia relativa con respecto a la línea base (% del control).
- 10 La administración intraperitoneal de 110 µg del Compuesto 5 produjo una reducción sostenida de la glucosa en sangre que alcanzó el punto más bajo 1-2 horas después de la administración del compuesto. No se observaron cambios en los animales tratados con solución salina. En la mayor parte de los grupos (5/6), la BG aumentó entre las 4 y 8 horas después de la administración del fármaco. El Compuesto 5 redujo los niveles de glucosa en sangre en una dosis de 110 µg/ratón cuando se administró i.p. a ratones ob/ob diabéticos (no se muestran los datos). Se observó el efecto antidiabético después de 60 minutos y fue máximo 2-4 h después de la administración del compuesto. Además, un efecto de larga duración (> 8 horas) sugiere que el Compuesto 5 tiene una duración de acción más larga que el GLP-1 natural de acción notablemente corta (Bailey, C. J. & Flatt, P. R. 1987. Glucagon-like peptide-1 and the entero-insular axis in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice. Life Sci. 40. 521-5). La dosis de 1100 µg/ratón p.o. provocó una reducción en la BG similar a la observada en los animales tratados con 110 µg i.p.
- 15
- 20 Se ha demostrado en esta invención que el Compuesto 5 reduce de modo eficaz los niveles de glucosa en sangre en ratones ob/ob diabéticos después de la administración i.p. de 110 µg de compuesto por ratón. Se observa un efecto similar después de 1100 µg/ratón del Compuesto 5 cuando se administra por vía oral. Esto da a entender que el compuesto se absorbe desde el tracto gastrointestinal.

25. Estudios *in vivo* con

- 25 Compuesto 1 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂),
Compuesto 2 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂),
Compuesto (iii) (Gly⁸-GLP1-(7-36)(Humano)-NH₂,
Compuesto 4 (Gly⁸-GLP1-(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂) y
Compuesto 5 (Gly⁸Lys³⁷(palmitoil)-GLP1-(7-36)(Humano)-Lys₇-NH₂)
- 30 Se administraron diversas concentraciones de cada péptido oralmente e intraperitonealmente a ratones *ob/ob* para determinar si estos compuestos afectan a los niveles de glucosa en sangre. Las condiciones experimentales usadas fueron las mismas descritas en el Ejemplo 24.

Péptidos y otros materiales

- 35 El des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂ (Compuesto 1), y el mismo péptido, pero con una secuencia adicional, Lys₆, incorporada al extremo C-terminal, el des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ (Compuesto 2), el Gly⁸-GLP1-(7-36)(Humano)-NH₂ (Compuesto (ii), y el mismo péptido, pero con una secuencia adicional, Lys₆, incorporada al extremo C-terminal, Gly⁸-GLP1-(7-36)(Humano)-Lys₆-NH₂ (Compuesto 4) y Gly⁸Lys³⁷(palmitoil)-GLP1-(7-36)(Humano)-Lys₇-NH₂ (Compuesto 5) se sintetizan utilizando los métodos descritos anteriormente. Las soluciones se preparan en la mañana de la administración, inmediatamente antes de administrarlas a los animales. Se usan las mismas soluciones tanto para la administración por vía oral como para la administración interperitoneal. Todos los péptidos se disuelven en NaCl isotónico estéril y se administran en un volumen de 0,2 mL. Todos los experimentos se llevan a cabo en los mismos ratones para comparar las dosis activas de los péptidos que se muestran en la Tabla 2. La toma de muestra de sangre se realiza como se ha descrito antes y a los animales se les administran las dosis que se muestran en la Tabla 3. Como control negativo, se administra la solución salina oralmente. Los resultados se muestran en la Tabla 4.
- 40
- 45

Tabla 2

Número	Compuesto
Compuesto 1	des Pro ³⁶ -exendina-4(1-39)-NH ₂
Compuesto 2	des Pro ³⁶ -exendina-4(1-39)-Lys ₆ -NH ₂
Compuesto (ii)	Gly ⁸ -GLPI-(7-36)(Humano)-NH ₂
Compuesto 4	Gly ⁸ -GLPI-(7-36)(Humano)-Lys ₆ -NH ₂
Compuesto 5	Gly ⁸ Lys ³⁷ (palmitoil)-GLPI-(7-36)(Humano)- Lys ₇ -NH ₂

Tabla 3

Compuesto	Grupo 1 Dosis oral µg/ratón	Grupo 2 Dosis oral µg/ratón	Grupo 3 Dosis oral µg/ratón	Grupo 4 Dosis oral µg/ratón	Grupo 5 Dosis oral µg/ratón Sol. salina isotónica	Grupo 6 Dosis i.p. µg/ratón
Compuesto 1	400	40	4	0,4	200 µL	40
Compuesto 2	1000	100	10	1	200 µL	100
Compuesto (ii)	1000	100	10	1	200 µL	100
Compuesto 4	1000	100	10	1	200 µL	100
Compuesto 5	1000	100	10	1	200 µL	100

- 5 Se resumieron los datos de grupo como la media $\pm$ SEM de los resultados individuales en cada grupo de tratamiento. Para analizar los efectos de los compuestos, se calculó la diferencia absoluta y relativa (% de t=0) con respecto a la línea base para cada punto de tiempo.

Tabla 4

	0	1 hora	2 horas	4 horas
Compuesto 1-solución salina	100	103	107	92
Compuesto 1-400 µg p.o.	100	93	88	93
Compuesto 1-40 µg p.o.	100	89	89	91
Compuesto 1-4 µg p.o.	100	105	88	91
Compuesto 1-0,4 µg p.o.	100	106	103	100
Compuesto 1-40 µg i. p.	100	68	69	74
Compuesto 2-solución salina	100	100	112	114
Compuesto 2-1000 µg p.o.	100	67	69	64
Compuesto 2-100 µg p.o.	100	78	71	72
Compuesto 2-10 µg p.o.	100	86	72	72
Compuesto 2-1 µg p.o.	100	112	101	96
Compuesto 2-100 µg i.p.	100	75	67	63
Compuesto (ii) –solución salina	100	95	87	100
Compuesto (ii)-1000 µg p.o.	100	87	105	94
Compuesto (ii) -100 µg p.o.	100	118	111	92
Compuesto (ii)- 10 µg p.o.	100	101	94	104
Compuesto (ii) -1 µg p.o.	100	94	89	96
Compuesto (ii) -100 µg i.p.	100	70	60	81
Compuesto 4 –solución salina	100	102	94	79
Compuesto 4 -1000 µg p.o.	100	128	72	78
Compuesto 4 -100 µg p.o.	100	72	70	58
Compuesto 4 -10 µg p.o.	100	98	95	81
Compuesto 4 -1 µg p.o.	100	99	89	84
Compuesto 4 100 µg i.p.	100	83	58	56
Compuesto 5 –solución salina	100	90	86	103
Compuesto 5 -1000 µg p.o.	100	73	75	67
Compuesto 5 -100 µg p.o.	100	97	140	107
Compuesto 5 -10 µg p.o.	100	90	120	126
Compuesto 5 - 1 µg p.o.	100	111	133	114
Compuesto 5 - 100 µg i.p.	100	63	50	52

- 10 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y en las Figuras 1-3.

Estos resultados muestran que todos los compuestos ensayados tienen un efecto de reducción de los niveles de glucosa en sangre. El efecto es más marcado cuando se administra el Compuesto 1 intraperitonealmente, mientras que el efecto de 1000 µg p.o. de Compuesto 2 es comparable al efecto de 100 µg i.p. de Compuesto 2. La potencia del Compuesto 1 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂) y del Compuesto 2 (des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂) cuando se administran intraperitonealmente, se ve que es muy similar a la de la propia exendina-4(1-39)-NH₂ (Compuesto (i)) (no se dan los datos) administrada del mismo modo.

Para el Compuesto 1, des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂, cuando se administra por vía oral no se produce ningún efecto de reducción de los niveles de glucosa en sangre hasta una dosis de 400 µg/ratón, mientras que para el mismo compuesto con la adición del fragmento Lys₆ se observa actividad a una dosis de 10 µg/ratón. Esto indica que la dosis oral mínima eficaz del compuesto des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ es al menos 40 veces más baja que la del compuesto des Pro³⁶-exendina-4(1-39)-NH₂.

Estos resultados demuestran que la incorporación de la secuencia Z no tiene efecto significativo sobre la potencia de los diferentes péptidos cuando se administran interperitonealmente mientras que aumenta significativamente la potencia del compuesto cuando se administra por vía oral.

26. Biodisponibilidad del Compuesto 4 y del Compuesto (iii) después de administración gastro-intestinal en el duodeno en ratas conscientes.

Se han desarrollado varios péptidos basados en análogos de GLP-1 para uso parenteral, pero ninguna de estas sustancias ha sido farmacológicamente eficaz después de la administración oral [Hoist. J. J.: Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol.* 59: 257-271. 1997]. Se decidió examinar la absorción del compuesto de ensayo desde el duodeno en ratas conscientes. Se utilizó el Compuesto (iii) (Gly⁸)hGLP-1(7-36)-NH₂ como referencia.

Productos químicos y reactivos

Los plasmas blancos de rata en heparina sódica (5000 unidades/mL) se obtuvieron de Harlan Sera Lab Ltd. (Loughborough, UK). Las columnas de extracción en fase sólida OASISTM HLB, de 1 cc, 30 mg de absorbente, se obtuvieron de Waters (Milford, MA, USA) y las columnas SPE ISOLUTE C18 (EC), de 1 cc, se obtuvieron de IST (Mid Glamorgan, U.K.). El análisis por LC/MS se realizó en un instrumento HP 1100 constituido por un desgasificador en línea, una bomba de gradiente binario, un automuestreador, una estufa para la columna, de Hewlett Packard (Wilmington, DE, USA) en combinación con un espectrómetro de masas Quattro Ultima de Micromass (Altrincham, UK), las dos operaciones, LC y MS se controlaron por el software MassLynx 3.3. Las separaciones por LC anteriores a la detección por MS se realizaron en una columna Vydac 218MS52 (2,1 x 250 mm) (Hesperia, CA, USA).

Fármacos y niveles de dosis

El Compuesto 4 (lote N° ZP 7.97-5-F, 4053 g/mol) y el Compuesto (iii) (lote N° ZP 7.73-2-G, 3854 g/mol) se sintetizaron internamente utilizando la estrategia Fmoc. Se realizó la identificación por espectrometría de masas y se determinó la pureza de los dos lotes por RP-HPLC resultando ser 97 y 99,7 % para los compuestos de ensayo, respectivamente. El contenido en péptidos de los lotes fue 72 % y 80 % para ZP 7.97-5-F y ZP 7.73-2-G, respectivamente. Se disolvieron los péptidos en solución salina isotónica exenta de pirógenos y se administraron dosis de 1000 o 10000 nmol/kg a través del catéter intraduodenal en un volumen de 100 µL.

Animales:

Se utilizaron para el experimento catorce ratas Sprague-Dawley con un peso de 250 a 350 g. Se anestesiaron las ratas con Hypnorm®-Dormicum® s.c. y se insertó un catéter en la arteria femoral para el muestreo de la sangre arterial. Se insertó un catéter adicional en el duodeno mediante una incisión en el ventrículo. Antes de empezar el experimento se dejó que las ratas se recuperaran durante una semana después de la operación. Las ratas operadas estaban conscientes el día del experimento. Con el fin de establecer si los catéteres intraduodenales estaban situados o no en el duodeno, se realizó una autopsia de las ratas inmediatamente después del experimento.

Tratamiento de las muestras:

Se recogieron muestras de sangre a los tiempos t = -5, 5, 10, 15, 20, 40, y 60 min. Se recogió la sangre en tubos enfriados con hielo que contenían EDTA y se centrifugaron inmediatamente a 4 °C durante 5 min (4000 x g). Se transfirió el plasma (250 µL) a viales de PLC de 0,75 mL enfriados con hielo que contenían 250 µL de la solución de extracción (MeCN:carbonato de amonio 0,18 M de pH 9,5, 10:90 v/v). Las muestras de plasma se conservaron a -20 °C hasta el análisis por SPE y LC/MS.

Extracción en fase sólida (SPE):

Se cargaron las muestras de plasma que contienen el fármaco (400 µL) en columnas de extracción en fase sólida preacondicionadas con 950 µL de MeCN seguido por 950 µL de agua. Se lavaron las columnas con 950 µL de TFA al 2 % en agua seguido por un volumen igual de TFA al 2 % en MeCN:agua (20:78 v/v). Se eluyeron los analitos con 500 µL de TFA al 2 % en MeCN:agua (60:38 v/v) y se analizaron por LC/MS.

LC/MS

Se mantuvieron las muestras a 18 °C en la bandeja del automuestreador antes de la inyección de 20 a 50 µL en la columna de LC (Vydac 218MS52 (2,1 x 250 mm)). Se realizaron las separaciones a 30 °C utilizando un caudal de 250 µL/min y un gradiente según la Tabla 1. Tanto el compuesto de ensayo como el fármaco de referencia se detectaron por registro de ion único (SIR) utilizando las especies iónicas de m/z = 676,7 y de m/z = 1095,2 y 821,8, respectivamente. Todas las condiciones instrumentales se controlaron por el software MassLynx versión 3.3.

Compuesto	Gradiente
Compuesto 4	Inicial: 15 % de B, 0-14 min; 15-30 % de B, 14-15 min; 50-15 % de B y 15-20 min 15 % de B.
Compuesto (iii)	Inicial: 25 % de B, 1-1,5 min; 25-30 % de B, 1,5-10 min; 30-40 % de B, 10-10,5 min; 40-90 % de B, 11,5-12 min; 90-25 % de B, y 12-17 min 25 % de B.
El gradiente usado para el análisis de los compuestos de ensayo utiliza ácido fórmico al 0,1 % en agua o en MeCN como fase móvil A o B, respectivamente	

Las muestras de plasma se analizaron como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Se examinó la biodisponibilidad del Compuesto 4 en dosis de 1000 (n=4) y 10000 (n=5) nmol/kg, mientras que el Compuesto (iii) sólo se estudió a dosis de 10000 (n=5) nmol/kg.

En todos los puntos de tiempo investigados la concentración del Compuesto (iii) estuvo por debajo del límite de detección (aproximadamente 0,5 nM), por tanto no se pudo estimar la biodisponibilidad exacta. En contraste, el Compuesto 4 se detectó en las muestras de plasma de dos de cuatro ratas después de la administración intraduodenal de 1000 nmol/kg y en cuatro de cinco ratas después de la administración de 10000 nmol/kg.

27. Farmacocinética *in vivo* del Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 4, y Compuesto (iii) después de administración i.v. a conejos y cerdos.

Se ha observado en esta invención un aumento de la estabilidad *in vitro* del Compuesto 4 agonista de GLP-1 cuando se compara con el fármaco de referencia, Compuesto (iii), en el plasma de rata. Para establecer si este efecto se mantiene o no *in vivo*, se examinaron los parámetros farmacocinéticos de los dos compuestos en conejos. Utilizando las mismas condiciones experimentales se midieron también estos parámetros para los Compuestos 1 y 2 en conejos y usando condiciones similares en cerdos.

Productos químicos y Reactivos

Los plasmas blancos de conejo en heparina sódica (5000 unidades/mL) se obtuvieron de Harlan Sera Lab Ltd. (Loughborough, Reino Unido). Las columnas de extracción en fase sólida OASISTM HLB, de 1 cc y 30 mg de absorbente, se obtuvieron de Waters (Milford, MA, EE.UU.) y las columnas SPE ISOLUTE C18 (EC), de 1 cc, se obtuvieron de IST (Mid Glamorgan, Reino Unido). El análisis por LC/MS se realizó en un instrumento HP 1100 constituido por un desgasificador en línea, una bomba de gradiente binario, un automuestreador, y una estufa para la columna, de Hewlett Packard (Wilmington, DE, EE.UU.) en combinación con un espectrómetro de masas Quattro Ultima de Micromass (Altrincham, Reino Unido), las dos operaciones, LC y MS se controlaron por el software MassLynx 3.3. Las separaciones por LC anteriores a la detección por MS se realizaron en una columna Vydac 218MS52 (2,1 x 250 mm) (Hesperia, CA, EE.UU.).

Fármacos y niveles de dosis:

El Compuesto 4 (lote N° ZP 7.97-5-F, 4053 g/mol) y el Compuesto (iii) (lote N° ZP 7.73-2-G, 3854 g/mol) se sintetizaron internamente utilizando la estrategia Fmoc. Se realizó la identificación por espectrometría de masas y se determinó la pureza de los dos lotes por RP-HPLC resultando ser 97 y 99,7 % para los compuestos de ensayo, respectivamente. El contenido en péptidos de los lotes fue 72 % y 80 % para ZP 7.97-5-F y ZP 7.73-2-G, respectivamente. Se disolvieron los péptidos en solución salina isotónica exenta de pirógenos y se administraron ambos péptidos i.v. a conejos y ratas utilizando una dosis de 1000 nmol/kg.

Conejos:

Se usaron para el experimento quince conejos de la raza Nueva Zelanda Blanco que pesaban 2,5 a 3,0 kg. El día del experimento, se anestesiaron los conejos con Hypnorm® i.m. seguido de Dormicum® i.v. Los catéteres se

insertaron en la vena femoral y en la arteria para la administración i.v. de los fármacos y la toma de muestra de sangre arterial. Los conejos permanecieron inconscientes durante todo el experimento.

Tratamiento de las muestras:

Se recogieron las muestras de sangre a los tiempos $t=1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180$, y 240 min. Se recogió la sangre en tubos enfriados con hielo que contenían EDTA y se centrifugaron inmediatamente a 4°C durante 5 min ($20000 \times g$). Se transfirió el plasma ($250 \mu\text{L}$) a viales PLC de $0,75$ mL enfriados con hielo que contenían $250 \mu\text{L}$ de la solución de extracción (MeCN:carbonato de amonio $0,18$ M pH $9,5$, $10:90$ v/v). Las muestras de plasma se conservaron a -20°C hasta el análisis por extracción en fase sólida (SPE) y por LC/MS.

Extracción en Fase Sólida:

Se cargaron las muestras de plasma que contienen el fármaco ($400 \mu\text{L}$) en las columnas de extracción en fase sólida OASISTM HLB (Compuesto 4) o ISOLUTETM (Compuesto (iii)) preacondicionadas con $950 \mu\text{L}$ de MeCN seguido de $950 \mu\text{L}$ de agua. Se lavaron las columnas con $250 \mu\text{L}$ de TFA al 2% en agua seguido por un volumen igual de TFA al 2% en MeCN:agua ($20:78$ v/v). Se eluyeron los analitos con $500 \mu\text{L}$ de TFA al 2% en MeCN:agua ($60:38$ v/v) y se analizaron por LC/MS.

LC/MS

Se mantuvieron las muestras a 18°C en la bandeja del automuestreador antes de la inyección de 20 a $50 \mu\text{L}$ en la columna de LC (Vydac 218MS52 ($2,1 \times 250$ mm)). Se realizaron las separaciones a 30°C usando un caudal de $250 \mu\text{L}/\text{min}$ y un gradiente según la tabla que sigue. Tanto el compuesto de ensayo como el fármaco de referencia se detectaron por registro de ion único (SIR) utilizando las especies iónicas de $m/z=676,7$ y de $m/z=1.095,2$ y $821,8$, respectivamente. Todas las condiciones instrumentales se controlaron por el software MassLynz versión 3.3.

Compuesto	Gradiente
Compuesto 4	Inicial: 15% de B, $0-14$ min; $15-30\%$ de B, $14-15$ min; $50-15\%$ de B y $15-20$ min 15% de B.
Compuesto (iii)	Inicial: 25% de B, $1-1,5$ min; $25-30\%$ de B, $1,5-10$ min; $30-40\%$ de B, $10-10,5$ min; $40-90\%$ de B, $11,5-12$ min; $90-25\%$ de B, y $12-17$ min 25% de B.
El gradiente usado para el análisis de los compuestos de ensayo utiliza ácido fórmico al $0,1\%$ en agua o en MeCN como fase móvil A o B, respectivamente	

Las muestras de plasma se analizaron según se describe en el apartado de Materiales y métodos y la concentración en plasma (C_{pi}) se representó frente al tiempo en un diagrama semilogarítmico. Se hizo seguimiento de la concentración en plasma durante tres horas en los conejos, pero el volumen limitado de sangre de las ratas, restringió el muestreo de sangre de esta especie a una hora. Las curvas de C_{pi} frente al tiempo de los conejos individuales se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimentos (no se muestra la figura) utilizando los mínimos cuadrados ponderados de $1/y^2$ con el programa WinNonlin 3.1 (Pharsight Corp. (Mountain View, CA)). Las constantes farmacocinéticas obtenidas del análisis de los datos se recogen en la Tabla 5, y la cinética de la degradación en conejos después de la inyección i.v. de $1 \mu\text{mol}/\text{kg}$ del Compuesto 4 y del Compuesto (iii), respectivamente, se muestra en la Fig. 4.

Tabla 5. Cinética *in vivo* en conejos y cerdos**

Parámetro	Compuesto (iii) (n=7) Media	Compuesto 4 (n=8) Media	Compuesto 1 (n=5) Media	Compuesto 2 (n=5) Media	Compuesto 2 ** (n=2) Media
$T_{1/2}, \alpha$ min	2,3	6,8	4,4	11	16
$T_{1/2}, \beta$ min	10,8	28,0	23	69	252

Tabla 5: Se obtuvieron las constantes farmacocinéticas de los conejos cuando se ajustaron matemáticamente las curvas de C_{pi} frente al tiempo. Los compuestos se administraron i.v. a una concentración de 1000 nmol/kg. Los valores $T_{1/2}$ se dan en minutos (min) para las fases α y β . Estadística: la prueba t de dos colas que asume muestras con varianzas desiguales, mostró una $p < 0,001$ para todos los parámetros medidos. En conclusión el valor $T_{1/2}$ para el Compuesto 4 es aproximadamente tres veces el valor del Compuesto (iii) de referencia y, asimismo, el valor $T_{1/2}$ para el Compuesto 2 es aproximadamente tres veces el valor calculado para el Compuesto 1 que representa al equivalente no conjugado.

28. Ensayo de tolerancia a la glucosa de los Compuestos 2, 14-16, 18 y 19 comparados con el Compuesto (i)

Se usaron ratones db/db diabéticos machos (M&B, Bomholdtgaard, LI., Skensved, Dinamarca). Este modelo de

ratón, bien descrito, ha heredado las disfunciones del metabolismo de la glucosa debido a una mutación en el receptor de leptina. Como en los pacientes humanos con diabetes mellitus no insulino dependiente descontrolada (NIDDM), los ratones homocigóticos db/db experimentan polidipsia, poliuria y glucosuria y ganan peso durante sus tres primeros meses de vida a pesar de su estado hiperglucémico. Sin embargo, en este modelo la hiperglucemia se asocia con la atrofia progresiva de los islotes pancreáticos, con una posible cetosis y con la muerte a los 6-8 meses de edad. De este modo, se debería prestar atención a la progresión y situación de la enfermedad. Por lo tanto, preferiblemente, sólo se deben usar ratones db/db de menos de 16 semanas de edad para los ensayos de fármacos de análogos de GLP-1.

Todos los animales se aclimatan durante al menos una semana y se manipulan diariamente durante dos días antes del primer ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Además, para reducir las desviaciones de la glucosa inducidas por el estrés, los animales se deben someter por los menos a un OGTT sin compuesto antes del experimento como se describe más adelante. Debido a la gran dispersión de la tolerancia a la glucosa entre los ratones diabéticos, los animales son estratificados mediante un OGTT antes de ser utilizados por primera vez.

Péptidos

Los péptidos se disuelven en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) con albúmina bovina al 0,1 % en la que se ajusta el pH a 7,4 añadiendo NaOH 5 M. Todas las soluciones se preparan frescas en la mañana inmediatamente antes del experimento. A los animales tratados con vehículo se les suministra solamente PBS con albúmina al 0,1 %.

Ensayo de tolerancia a la glucosa y dosificación

Antes del ensayo de tolerancia a la glucosa oral, los animales se mantienen en ayunas durante 17 horas (desde las 4 p.m. hasta las 9 a.m. de la mañana siguiente). A partir de las 9.00 a.m., se toma sangre de la punta de la cola ($t = -15$ min) y se mide la glucosa en sangre. La concentración total de glucosa en sangre (mM) se analiza por el método de glucosa oxidasa inmovilizada utilizando una gota de sangre ($< 5 \mu\text{L}$, Elite Autoanalyser, Bayer, Dinamarca) siguiendo el manual del fabricante. Se excluyen los animales con diabetes severa (> 10 mM). Inmediatamente después de la muestra de sangre inicial, los animales reciben una inyección intraperitoneal (i.p.) de vehículo o una dosis de compuesto antidiabético. El volumen de inyección es $200 \mu\text{L}/50$ g de peso corporal en todos los grupos. Quince minutos después de la administración i.p. de la sustancia se administra una dosis oral de 1 g de glucosa/kg (Sigma, St. Louis) disuelta en agua ($200 \mu\text{L}/50$ g de peso corporal), y se devuelven los animales a sus jaulas ($t = 0$). Los niveles de glucosa en sangre se miden a los tiempos $t = 30$ min, $t = 60$ min, $t = 120$ min y $t = 240$ min. Se mantienen los animales en ayunas durante el periodo de observación. Para cada animal se rellenó una hoja de registro de datos en el momento de cada toma de muestra de sangre.

Cálculos y estadística

Para analizar los efectos de los compuestos, se calcula la diferencia absoluta y relativa con respecto a la línea base ($t = 0$) para cada punto de tiempo. Se determina el área bajo la curva del experimento completo (AUC 0-240 min) usando el método de los trapecios. El día de la estratificación, se distribuyen los ratones con el fin de asegurar que las tolerancias a la glucosa son similares en todos los grupos. Sin embargo, para corregir la progresión de la diabetes con el tiempo, se ensaya un grupo control tratado con vehículo cada día del experimento y se expresa la respuesta a los fármacos en relación a la respuesta observada con el tiempo en los animales control tratados con vehículo.

Se representan las curvas dosis-respuesta para cada sustancia, véase la Fig.5, y se analiza el efecto del fármaco con relación a las respuestas obtenidas durante el tratamiento con vehículo utilizando un análisis de ANCOVA (análisis de covarianza). El tratamiento (fármaco o vehículo) se considera la variable independiente, el AUC 0-240 min expresada como el porcentaje de la respuesta observada con el tiempo en los ratones control tratados con vehículo es la variable dependiente y la dosis del fármaco se define como la covariable. Se realiza el análisis post-hoc usando la prueba de mínimos significativos de Fisher. Las diferencias se consideran significativas al nivel de 0,05. Se realizaron los análisis estadísticos utilizando el programa Statistica versión 5.5 para Windows NT, StatSoft, Tulsa, Oklahoma, EE.UU. Las curvas dosis-respuesta representadas en la Fig. 5 muestran claramente que todos los compuestos ensayados presentan un efecto de reducción de la glucosa comparable al del fármaco de referencia.

29. Efectos del Compuesto 2 y del Compuesto (i) sobre OGGT en ratones db/db

La Figura 7 es un gráfico del AUC para el Compuesto 2 y el Compuesto (i) en un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) realizado utilizando las mismas condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 28. La figura muestra que el efecto de reducción de la glucosa en sangre del Compuesto 2 es el mismo que el efecto del compuesto (i) de la técnica anterior.

30. Efectos a largo plazo del Compuesto 2, 100 nmol/kg i.p., en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) cuando se administra hasta 24 horas antes del OGTT

5 Este experimento utiliza la dosis máxima de 100 nmol/kg i.p. en ratones db/db y por lo demás, se usan las mismas condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 28. En la Fig. 8 se muestran los resultados y la conclusión del experimento es que la duración de la acción del Compuesto 2 en ratones db/db es de hasta 18 horas.

10 La invención descrita y reivindicada en la presente memoria no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas aquí, puesto que se pretende que estas realizaciones sirvan como ilustraciones de varios aspectos de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria resultarán obvias para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado peptídico que comprende un péptido X seleccionado entre GLP-1 (7-36) y GLP-1 (7-37), que tiene al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en:
 - (i) sustitución de la alanina en la posición 8 por D-alanina, glicina o ácido alfa-amino-isobutírico; y
 - (ii) un sustituyente lipófilo;
 en el que el péptido X está acoplado por medio de su terminal N o C a una secuencia de aminoácidos Z, donde Z tiene la secuencia (Lys)_n, en la que n es un número entero en el intervalo de 4 a 15; o una sal farmacéuticamente aceptable o una amida C-terminal de dicho conjugado peptídico.
2. El conjugado peptídico según la reivindicación 1, en el que el péptido X se caracteriza además por ser eficaz para mejorar la tolerancia a la glucosa en un mamífero diabético.
3. El conjugado peptídico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la relación entre la dosis mínima eficaz de dicho conjugado peptídico y la dosis oral mínima eficaz del péptido X es al menos 1:5.
4. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustituyente lipófilo es un grupo palmitoil unido al grupo epsilon-amino de una Lys en el péptido X.
5. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X se selecciona del grupo que consiste en Gly⁸-GLP-1-(7-36)(Humano)-NH₂, Gly⁸-GLP-1-(7-36)(Humano), Gly⁸Lys³⁷(palmitoil)-GLP-1-(7-36)(Humano), Gly⁸Lys³⁴(palmitoil)-GLP-1-(7-36)(Humano), y los ácidos libres o amidas primarias de C-terminal y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
6. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho péptido X se selecciona del grupo que consiste en un GLP-1 (7-36)-NH₂ que tiene al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en la sustitución de alanina por glicina en la posición 8 y un grupo palmitoil lipófilo unido a una lisina en la posición 26, 34 o 37, y el ácido libre y una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
7. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustituyente lipófilo está unido al grupo epsilon-amino de una Lys en dicho GLP-1.
8. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X está unido a Z mediante un enlace peptídico.
9. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la carga total de la secuencia peptídica (Z) está en el intervalo de 0 a +15 a pH 7, preferiblemente en el intervalo de 0 a +10, tal como en el intervalo de 0 a +8, más preferiblemente en el intervalo de 0 a +7 o de 0 a +6.
10. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que n es un número entero en el intervalo de 4 a 10, tal como en el intervalo de 4 a 8, por ejemplo en el intervalo de 4 a 7.
11. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Z es Lys₆ o Lys₇.
12. El conjugado peptídico según la reivindicación 1, en el que Z está representado por Lys₈ unido al C- terminal de X.
13. El conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos residuos de aminoácidos tienen una configuración L.
14. El conjugado peptídico según la reivindicación 1, en el que dicho conjugado se selecciona del grupo que consiste en:

Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₈-NH₂,
 Lys₈-Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₆-NH₂,
 Lys₈-Gly⁸-GLP-1 (7-36)-NH₂,
 Gly⁸-Lys³⁷(palmitoil)-GLP-1(7-36)(Humano)-Lys₇-NH₂,
 Gly⁸-Lys²⁸(palmitoil)-GLP-1 (7-36)(Humano)-Lys₈-NH₂,
 Gly⁸-Lys³⁴(palmitoil)-GLP-1 (7-36)(Humano)-Lys₈-NH₂,
 Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₈-NH₂,
 Gly⁸-GLP-1(7-36)-Lys₁₀-NH₂, y
 Gly⁸-GLP-1 (7-37)-Lys₈-NH₂,
 o uno de sus ácidos libres y una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
15. El conjugado peptídico según la reivindicación 1, que comprende X, un agonista peptídico de la actividad de GLP-1 en el que X se selecciona del grupo que consiste en:

Gly⁸-GLP-1 (7-36)-NH₂, y Gly⁸-GLP-1 (7-36),

y en el que X está unido en el C-terminal por un enlace peptídico a una secuencia peptídica Z seleccionada del grupo que consiste en (Lys)_n en la que n es un número entero de 4 a 8, preferiblemente n es 6, y el ácido libre del mismo y una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 16. Un conjugado farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para uso en terapia.
17. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, en la que el conjugado peptídico activo se selecciona del grupo que consiste en Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₇-NH₂, Gly⁸-GLP-1 (7-36)-Lys₇-NH₂, y el ácido libre del mismo y una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
19. Un método para producir los conjugados peptídicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende
 - 15 a) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia peptídica de dicho conjugado peptídico y un marcador seleccionable contenido en una construcción de ácido nucleico o un vector dentro de una célula hospedante para obtener una célula hospedante recombinante;
 - b) seleccionar dicha célula hospedante recombinante;
 - c) cultivar dichas células hospedantes recombinantes en condiciones que permiten la producción de dicha secuencia polipeptídica;
 - 20 d) aislar dicha secuencia polipeptídica del cultivo; y
 - e) desanclar opcionalmente dicha secuencia polipeptídica utilizando una proteasa apropiada para obtener dicho conjugado peptídico.
20. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 25 21. Un conjugado peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para uso en terapia.
22. El uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 1 o tipo 2, síndrome de resistencia a la insulina, obesidad, trastornos alimenticios, hiperglucemia, trastornos metabólicos, y enfermedad gástrica.
- 30 23. El uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con niveles elevados de glucosa en sangre provocados por hormonas de las que se sabe que hacen aumentar los niveles de glucosa en sangre, tales como las catecol-aminas incluyendo la adrenalina, los glucocorticoides, la hormona del crecimiento y el glucagón.
- 35 24. El uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la fabricación de un medicamento para la regulación de los niveles de glucosa en sangre.
25. El uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la fabricación de un medicamento para la regulación del vaciado gástrico.
26. El uso de un conjugado peptídico farmacéuticamente activo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la fabricación de un medicamento para reducir la mortalidad y morbilidad después de un infarto de miocardio.

40

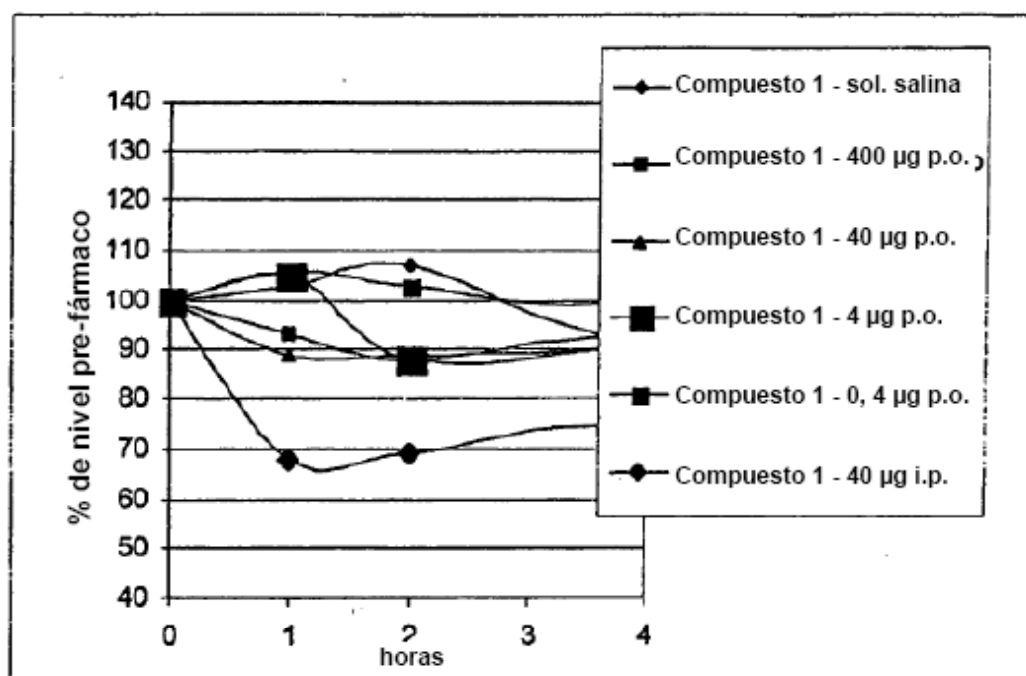


Fig. 1

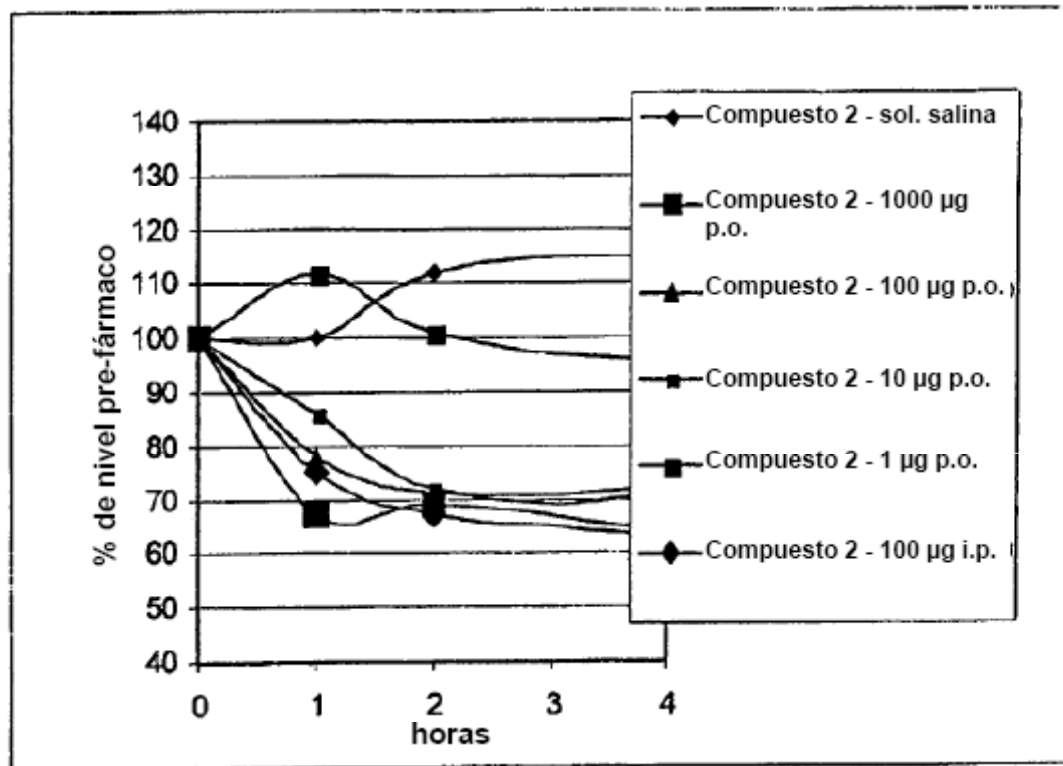


Fig. 2

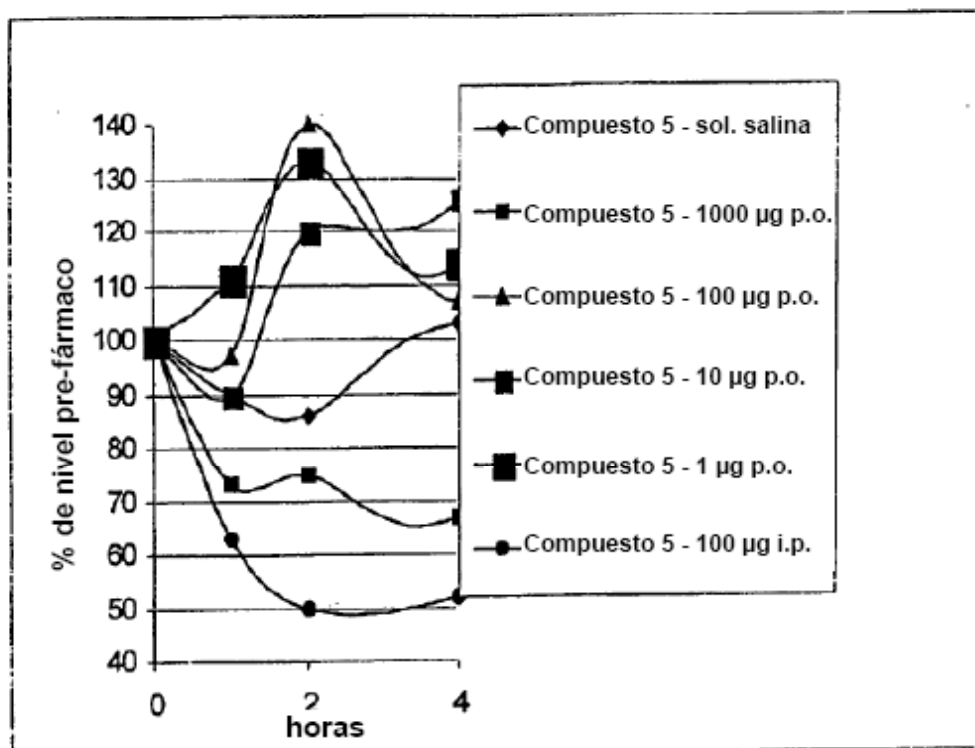


Fig. 3

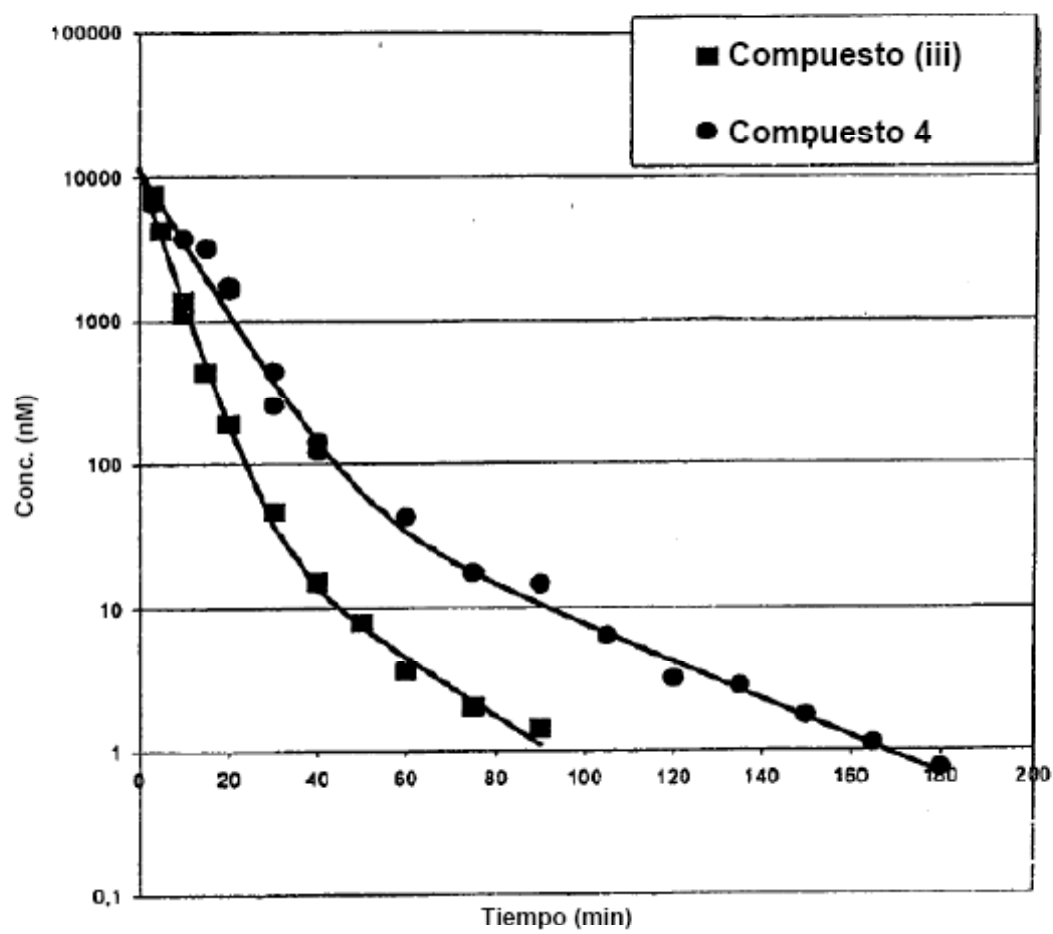


Fig. 4

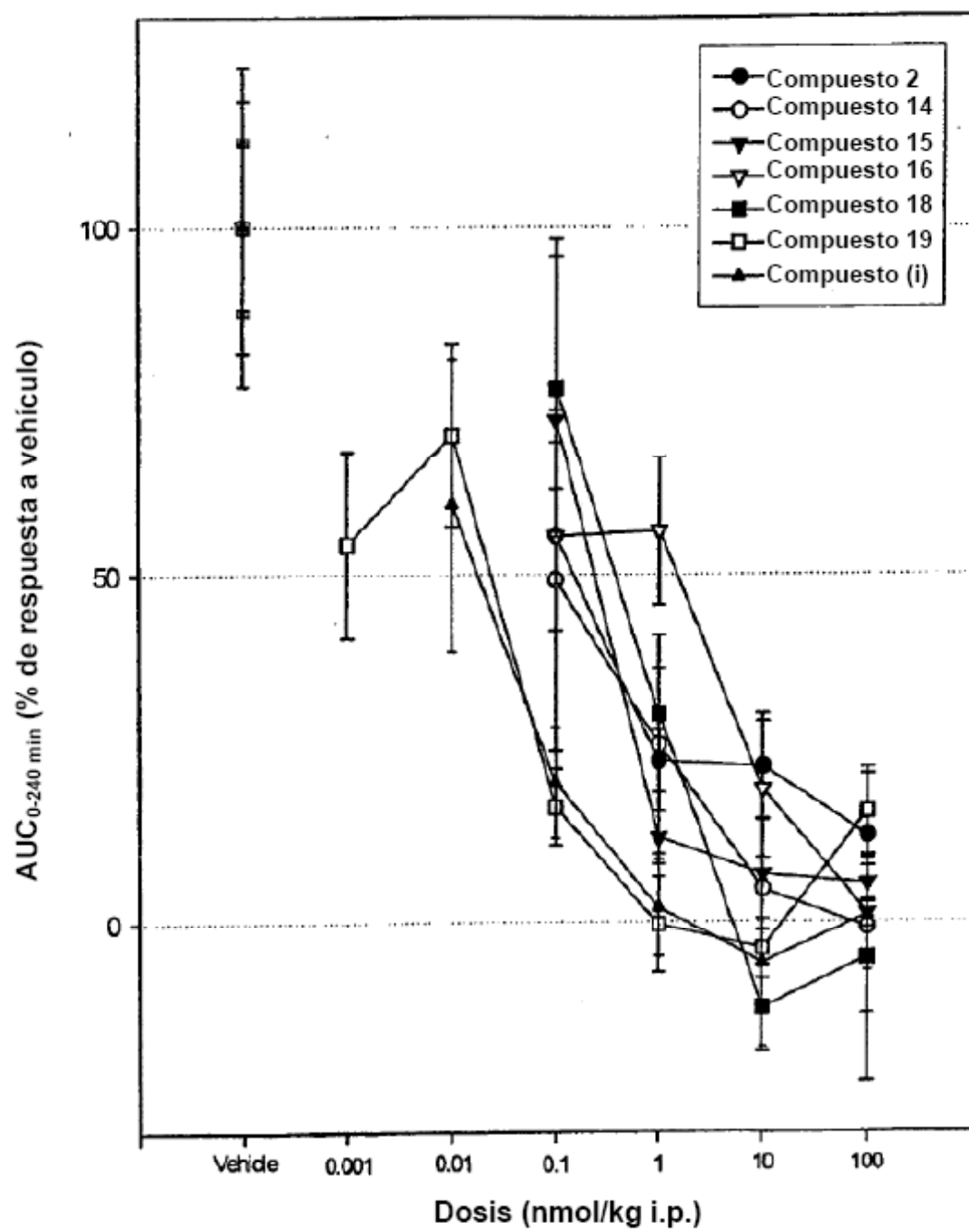


Fig. 5

5' ATGCATGGTGAGGGTACATTACATCTGATTTGTCTAAGCAAATGGAGGAGGAGGCTGTTGCTTTGTTTCATTGAGTGGT
GAAGAATGGTGGTCCATCTTCTGGTGCTCCACCATCTAAGAAGAAGAAGAAGTAA 3'

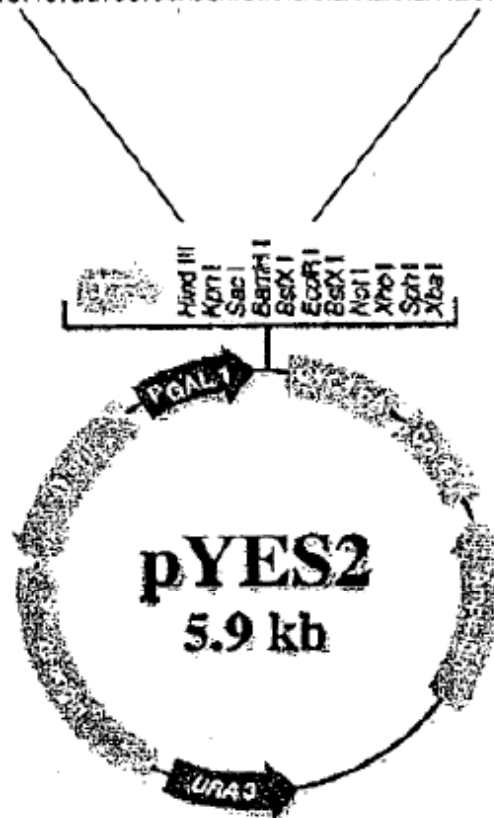


Fig. 6

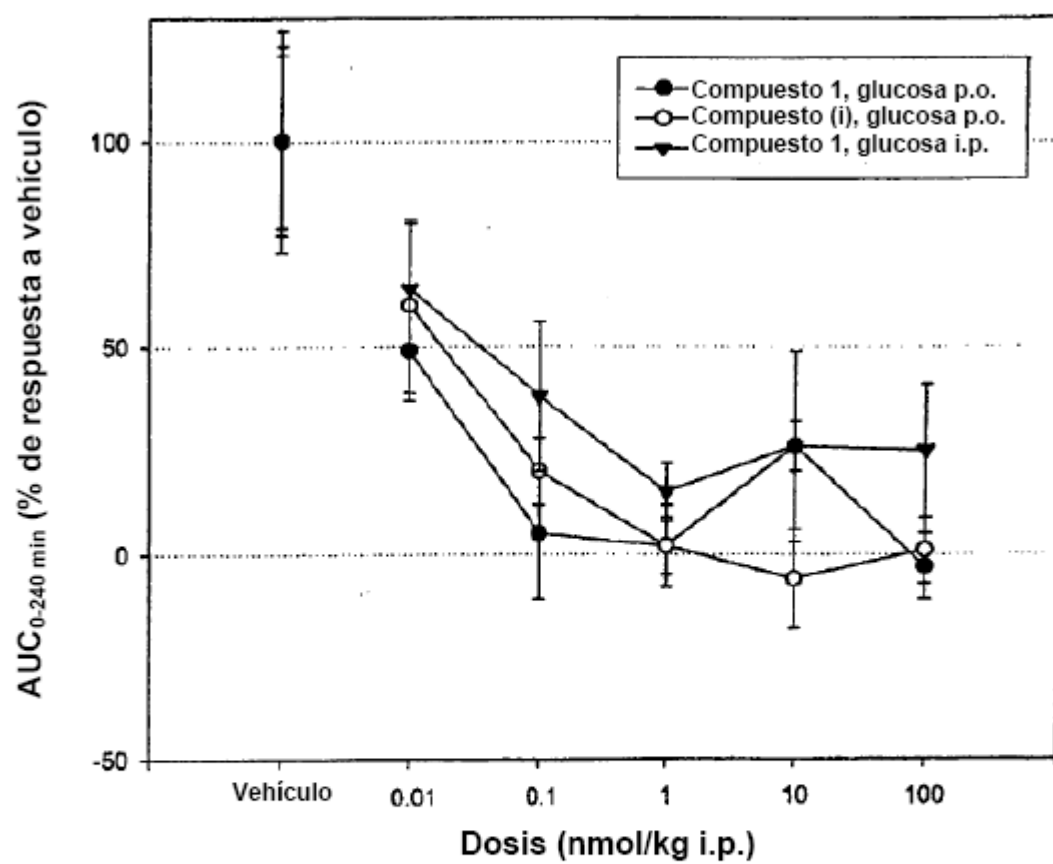
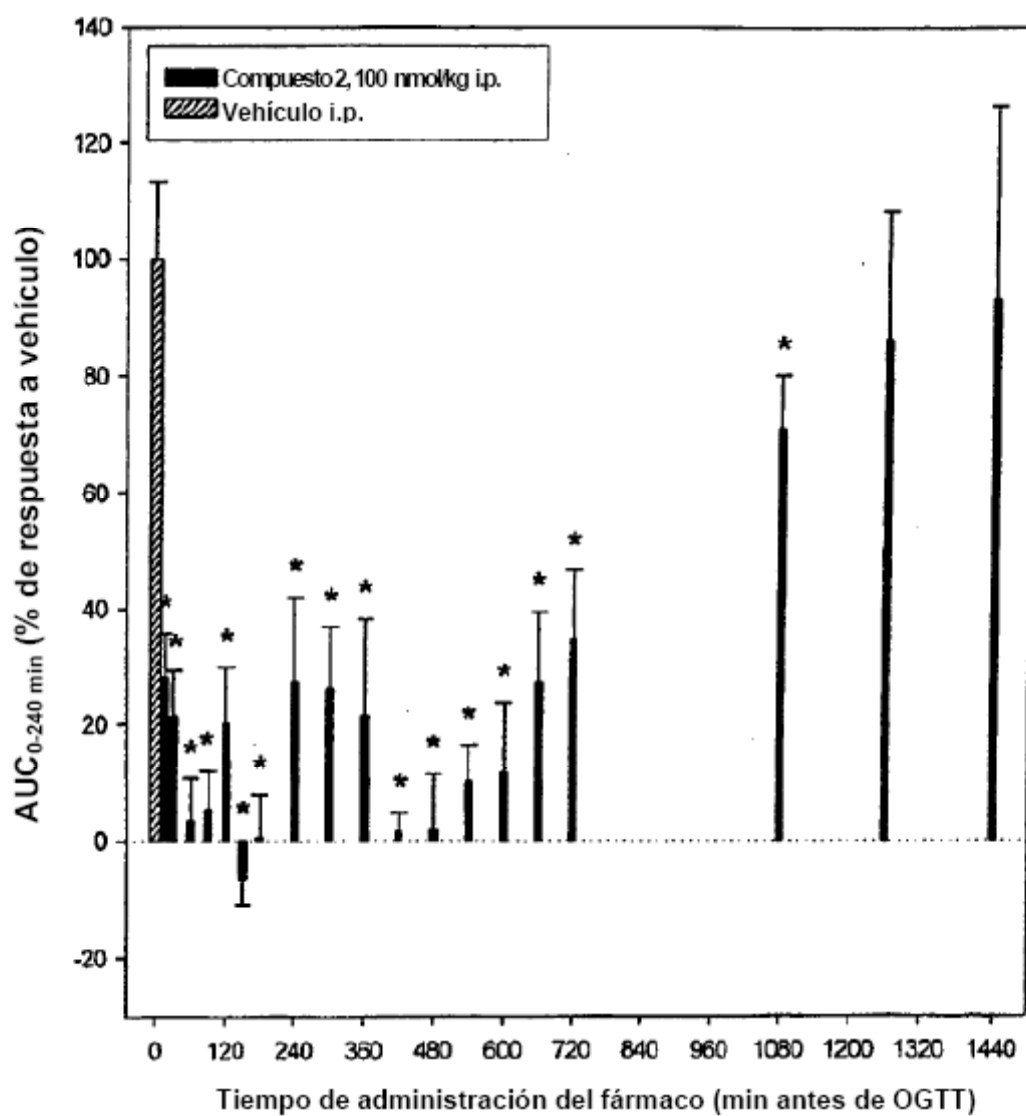


Fig. 7



* p<0,05 frente a vehículo

Fig. 8