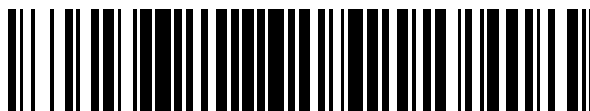


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 286**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07C 323/12** (2006.01)  
**C07D 213/70** (2006.01)  
**C07K 14/605** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06847728 .0**  
96 Fecha de presentación: **18.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1968644**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Conjugados poliméricos de GLP-1**

30 Prioridad:  
**16.12.2005 US 751121 P**  
**16.12.2005 US 751082 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.11.2012**

73 Titular/es:  
**NEKTAR THERAPEUTICS (100.0%)**  
**455 Mission Bay Boulevard South Suite 100**  
**San Francisco CA 94158, US**

72 Inventor/es:  
**BOSSARD, MARY J.;**  
**FANG, ZHIHAO;**  
**VIEGAS, TACEY;**  
**THOMPSON, STEWART y**  
**KUO, MEI-CHANG**

74 Agente/Representante:  
**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

ES 2 390 286 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugados poliméricos de GLP-1

## 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica las ventajas de prioridad para las siguientes solicitudes de patente provisionales: Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/751.121, presentada el 16 de diciembre de 2005, y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/751.082, presentada el 16 de diciembre de 2005.

10

## Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a productos farmacéuticos. Por ejemplo, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden un resto GLP-1 (péptido-1 similar al glucagón) unido covalentemente a uno o más polímeros solubles en agua. Entre otras cosas, la invención se refiere adicionalmente a procedimientos para sintetizar conjugados poliméricos de GLP-1, composiciones que comprenden dichos conjugados, y procedimientos para tratar patentes mediante la administración de conjugados de GLP-1.

15

## 20 Antecedentes de la invención

El péptido-1 similar al glucagón (denominado en lo sucesivo en este documento GLP-1) es un péptido obtenido a partir de proglucagón secretado por los linfocitos T intestinales en respuesta a la ingestión de nutrientes (Drucker, DJ: *The Glucagon-Like Peptides*. *Diabetes* 47: 159-169, 1998). El GLP-1 actúa como una incretina para estimular la liberación de insulina de las células beta pancreáticas junto con carbohidratos que se absorben en los intestinos. El GLP-1 también ejerce acciones independientes de la secreción de hormonas de los islotes, incluyendo la inhibición tanto del vaciado gástrico como de la ingesta de alimentos y la estimulación de la proliferación de células  $\beta$ .

25

El documento WO 2004/089280 describe un conjugado polimérico de GLP-1 que comprende un resto (que se extiende a 4) que puede liberarse unido a través de un resto fluorenilmetilo en su extremo final a un polímero soluble en agua.

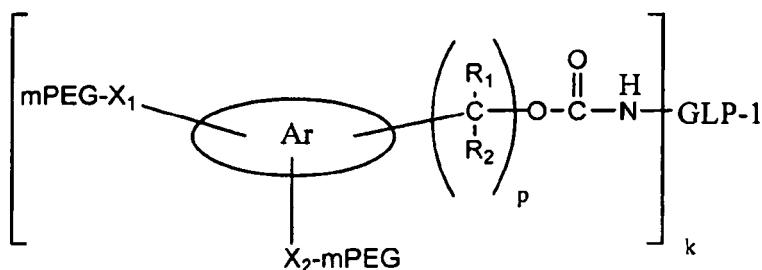
30

Aunque estos y otros diversos enfoques parecen describir compuestos de GLP-1 que tienen propiedades terapéuticas mejoradas en comparación con el GLP-1 nativo, aún existe la necesidad de compuestos de GLP-1 mejorados capaces de proporcionar ventajas terapéuticas adicionales sobre los agentes terapéuticos basados en GLP-1 existentes. Por lo tanto, permanece la necesidad en la técnica de proporcionar conjugados poliméricos del resto GLP-1 ventajosos adicionales. Por lo tanto, entre otras cosas, una o más realizaciones de la presente invención se refieren a dichos conjugados, así como a composiciones que comprenden los conjugados y procedimientos relacionados como se describe en este documento.

35

## 40 Sumario de la invención

Por consiguiente, la invención propone un conjugado polimérico de GLP-1 que comprende un resto GLP-1 unido en su extremo N a un polímero no peptídico soluble en agua, que tiene la estructura:



45

en la que:

mPEG es CH<sub>3</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,

50

n varía de 10 a 1800,

p es un número entero que varía de 1 a 8,

55

R<sub>1</sub> es H o un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sub>2</sub> es H o un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

Ar es un hidrocarburo aromático,

5 cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> es independientemente un resto separador que tiene una longitud de átomo de 1 a 18 átomos,

k es 1, 2 ó 3, y

-NH-GLP-1 es un resto GLP-1, en el que -NH- de -NH-GLP-1 representa un grupo amino del resto GLP-1.

10 En una o más realizaciones, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular que varía de 500 daltons a 80.000 daltons, tal como de 1000 daltons a 40.000 daltons.

15 En todavía una o más realizaciones adicionales, el polímero soluble en agua tiene una estructura seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multi-ramificada.

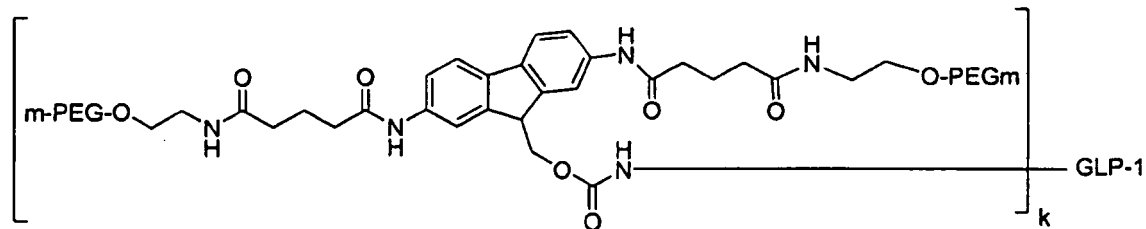
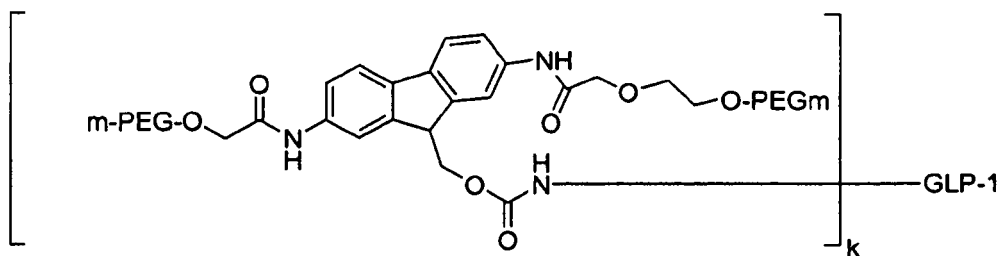
En todavía una o más realizaciones adicionales, el resto GLP-1 está glicosilado.

20 En todavía una o más realizaciones adicionales, el conjugado polimérico de GLP-1 posee un sustituyente N-metilo en una cualquiera o más de las posiciones 7-His, 8-Ala y 9-ácido glutámico del resto GLP-1.

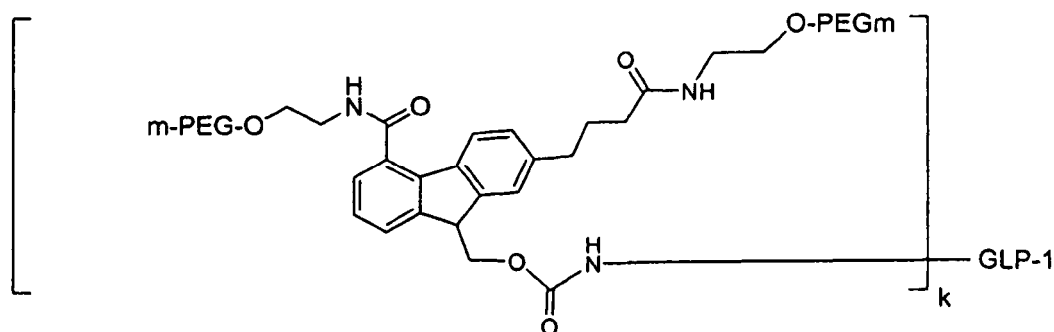
En referencia a la estructura anterior, en una o más realizaciones específicas, p es 1 y cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es H. En todavía una o más realizaciones alternativas, cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> comprende al menos un enlace amida. En todavía una o más realizaciones adicionales, X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son el mismo.

25 En referencia a la estructura anterior, cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, en ciertas realizaciones, puede poseer independientemente una estructura seleccionada entre -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-, NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-O-, -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-C(O)-NH-, -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>- y -C(O)-NH-, en la que q se selecciona entre 2, 3, 4 y 5. En todavía una o más realizaciones adicionales, Ar se selecciona entre pentaleno, indeno, naftaleno, indaceno, acenaftileno y fluoreno.

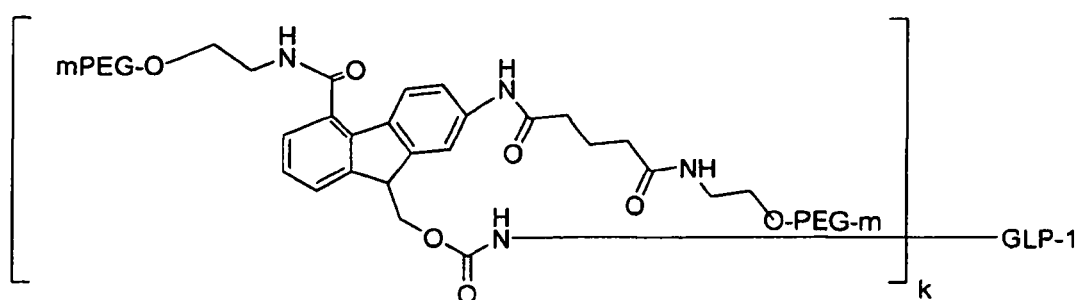
30 Los conjugados poliméricos de GLP-1 ilustrativos de la invención incluyen los siguientes conjugados liberables:



35



y



5

### Breve descripción de las figuras

La presente invención se describe adicionalmente en la descripción de la invención que viene a continuación, en referencia a la pluralidad señalada de dibujos no limitantes, en los que:

La figura 1 corresponde a un análisis SDS-PAGE de una mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-GLP-1 como se describe en el Ejemplo 3. Hilera 1: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen. Hilera 2: mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1.

La figura 2 demuestra los resultados de la purificación de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado mediante cromatografía de intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 3.

La figura 3 corresponde a un análisis SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado antes y después de la liberación de GLP-1 (Ejemplo 3). Hilera 1: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen. Hilera 2: Conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico. Hilera 3: Tras la liberación completa de GLP-1 del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1.

Las figuras 4A, 4B muestran un análisis de HPLC de fase inversa de un conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico (figura 4A) y después de la liberación de GLP-1 del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (figura 4B), como se describe en el Ejemplo 3.

La figura 5 ilustra los resultados de la purificación de G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado mediante cromatografía de intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 4.

La figura 6 muestra los resultados de un análisis SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado antes y después de la liberación de GLP-1 (Ejemplo 4). Hilera 1: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen. Hilera 2: Conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 monoPEGilado tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico. Hilera 3: Tras la liberación de GLP-1 del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1.

La figura 7 demuestra la purificación de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado mediante cromatografía de intercambio catiónico (Ejemplo 5).

La figura 8 corresponde a un análisis SDS-PAGE de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico (Ejemplo 5). Hilera 1: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen. Hileras 2 a 6: Fracciones que contienen conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado tras cinco purificaciones individuales mediante cromatografía de intercambio iónico.

La figura 9 ilustra los resultados de la purificación de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado mediante cromatografía de intercambio catiónico (Ejemplo 6).

5 La figura 10 representa un análisis SDS-PAGE de la mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 y fracciones de una purificación por cromatografía de intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 6 Hilera 1: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen. Hilera 2: Mezcla de reacción de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1. Hilera 3-5: Fracciones del pico a un volumen de retención de 9,37 ml. Carriles 6-10: Fracciones de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado recogidas del pico a un volumen de retención de 158,3 ml.

10 La figura 11 demuestra los resultados de la purificación de mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado mediante cromatografía de intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 7.

15 La figura 12 corresponde a un análisis SDS-PAGE del mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 purificado (Ejemplo 7). Hilera 1: mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado después de la purificación por cromatografía. Hilera 2: estándar no teñido Mark 12 de Invitrogen.

20 La figura 13 es un gráfico que demuestra los efectos de la disminución de glucosa en sangre comparativos en el tiempo de GLP-1, el conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1 y el conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 cuando se administran por vía subcutánea a ratones db/db como se describe en el Ejemplo 8.

La figura 14 es un gráfico que demuestra los efectos de la disminución de glucosa en sangre comparativos en el tiempo de GLP-1, el conjugado G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y el conjugado G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 cuando se administran por vía subcutánea a ratones db/db como se describe en el Ejemplo 8.

25 La figura 15 es un gráfico que muestra el perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 como se describe en el Ejemplo 21.

30 La figura 16 es un gráfico de concentraciones de glucosa en sangre medias en grupo en ratones a los que se les administró exenatida (subcutánea), PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (intratraqueal) o vehículo (intratraqueal). Las concentraciones de glucosa en sangre se expresan como % del valor medido 24 horas previas a la dosis como se describe en el Ejemplo 25.

35 La figura 17 es un gráfico de concentraciones de glucosa en sangre medias en grupo en ratones a los que se les administró exenatida (subcutánea), mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (intratraqueal) o vehículo (intratraqueal) como se describe en el Ejemplo 26.

### Descripción de la invención

40 A menos que se indique otra cosa, una referencia a un compuesto o componente incluye el propio compuesto o componente, así como en combinación con otros compuestos o componentes, tales como mezclas de compuestos.

45 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "la", "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye un único polímero, así como dos o más de los mismos o diferentes polímeros, la referencia a "un excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un solo excipiente farmacéuticamente aceptable, así como a dos o más de los mismos o diferentes excipientes farmacéuticamente aceptables, y similares.

50 Al describir y reivindicar la presente invención o invenciones, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se proporcionan a continuación.

"PEG", "polietilenglicol" y "poli(etilenglicol)", como se usan en este documento, son intercambiables. Típicamente, los PEG para su uso de acuerdo con la invención comprenden la siguiente estructura:  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  en la que (n) es de 2 a 4000. Como se usa en este documento, PEG también incluye  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-$ , dependiendo de si se han desplazado o no los oxígenos terminales. Cuando el PEG comprende adicionalmente un resto separador o un enlazador unido covalentemente al mismo (se describirá en más detalle más adelante), los átomos que comprenden el resto separador o el enlazador, cuando se unen covalentemente al PEG, no dan como resultado la formación de un enlace oxígeno-oxígeno (es decir, un "-O-O-" o enlace peróxido). A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, debe recordarse que el término "PEG" incluye estructuras que tienen diversos grupos terminales o "de protección terminal". El término "PEG" también se refiere a un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50%, de unidades de repetición de  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ . Con respecto a formas específicas, el PEG puede tomar cualquier número de una diversidad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías, tales como "ramificada", "lineal", "bifurcada", "multifuncional", y similares, que se describirán en más detalle en este documento.

65 Las expresiones "protegido en el extremo" y "terminalmente protegido" se forman de forma intercambiable en este

documento para hacer referencia a un extremo o punto final de un polímero que tiene un resto de protección terminal. Típicamente, aunque no necesariamente, el resto de protección terminal comprende un grupo hidroxilo o alcoxi C<sub>1-20</sub>, tal como un grupo alcoxi C<sub>1-10</sub> o un grupo alcoxi C<sub>1-5</sub>. Por lo tanto, los ejemplos de restos de protección terminal incluyen alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi), benciloxi, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y similares. El resto de protección terminal puede incluir uno o más átomos del monómero terminal en el polímero [por ejemplo, el resto de protección terminal "metoxi" en CH<sub>3</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]. Además, se prevén las formas saturadas, insaturadas, sustituidas y no sustituidas de cada uno de los anteriores. Además, el grupo de protección terminal también puede ser un silano. El grupo de protección terminal también puede comprender ventajosamente un marcador detectable. Cuando el polímero tiene un grupo de protección terminal que comprende un marcador detectable, la cantidad y/o la ubicación del polímero y/o el resto (por ejemplo, agente activo) al que el polímero se acopla puede determinarse usando un detector adecuado. Dichos marcadores incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, restos usados en el marcaje enzimático, restos colorimétricos (por ejemplo, tintes), iones metálicos, restos radioactivos, y similares. Dichos detectores adecuados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros, y similares.

"Que no es de origen natural" con respecto a un polímero como se describe en este documento, se refiere a un polímero que en su totalidad no se encuentra en la naturaleza, es decir, es sintético. Sin embargo, un polímero que no es de origen natural puede contener uno o más monómeros o segmentos de monómeros que son de origen natural, siempre que la estructura general del polímero no sea de origen natural.

La expresión "soluble en agua" como en un "polímero soluble en agua" es cualquier polímero que sea soluble en agua a temperatura ambiente. El polímero soluble en agua es un polímero que tiene una solubilidad del 1% (p/v) o más en agua a 25 °C. Típicamente, un polímero soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente el 75%, tal como al menos aproximadamente el 95%, de luz transmitida por la misma solución después de la filtración. En una base en peso, un polímero soluble en agua a menudo será al menos aproximadamente el 35% (p/v) soluble en agua, tal como al menos aproximadamente el 50% (p/v) soluble en agua, al menos aproximadamente el 70% (p/v) soluble en agua, o al menos aproximadamente el 85% (p/v) soluble en agua, a 25 °C. Típicamente, el polímero soluble en agua es al menos aproximadamente el 95% (p/v) soluble en agua o completamente soluble en agua.

"Hidrófilo", por ejemplo en referencia a un "polímero hidrófilo", se refiere a un polímero que se caracteriza por su solubilidad en y su compatibilidad con el agua. En una forma no reticulada, un polímero hidrófilo es capaz de disolverse en, o dispersarse en agua. Típicamente, un polímero hidrófilo posee una estructura polimérica compuesta de carbono e hidrógeno, y generalmente posee un alto porcentaje de oxígeno en la estructura polimérica principal o los grupos colgantes sustituidos a lo largo de la estructura polimérica, lo que lleva de este modo a su naturaleza "atrayente del agua". Los polímeros solubles en agua de la presente invención son típicamente hidrófilos, por ejemplo, hidrófilos de origen no natural.

Peso molecular en el contexto de un polímero soluble en agua, tal como PEG, puede expresarse como un peso molecular medio numérico o un peso molecular medio en peso. A menos que se indique otra cosa, todas las referencias a peso molecular en este documento se refieren a peso molecular medio en peso. Ambas denominaciones de peso molecular, medio numérico y medio en peso, pueden medirse usando técnicas cromatográficas de permeación en gel u otras técnicas cromatográficas líquidas. También pueden usarse otros procedimientos para medir los valores del peso molecular, tales como uso de análisis de grupos terminales o la medición de propiedades coligativas (por ejemplo, depresión del punto de congelación, elevación del punto de ebullición o presión osmótica) para determinar el peso molecular medio numérico o el uso de técnicas de turbidez de la luz, ultracentrifugación o viscosimetría para determinar el peso molecular medio en peso. Los polímeros de la invención son típicamente polidispersos (es decir, el peso molecular medio numérico y el peso molecular medio en peso de los polímeros no son iguales), teniendo valores de polidispersidad bajos, tales como menos de aproximadamente 1,2, menos de aproximadamente 1,15, menos de aproximadamente 1,10, menos de aproximadamente 1,05, y menos de aproximadamente 1,03. Como se usa en este documento, a veces se hará referencia a un único polímero soluble en agua que tiene un peso molecular medio en peso o un peso molecular medio numérico; se entenderá que dichas referencias se refieren a que el polímero soluble en agua individual se obtuvo a partir de una composición de polímeros solubles en agua que tenían el peso molecular indicado.

Las expresiones "activo" o "activado" cuando se usan junto con un grupo funcional particular, se refieren a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo en otra molécula. Esto es a diferencia de los grupos que requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción muy poco prácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

Como se usa en este documento, la expresión "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo se refiere a que incluye formas protegidas del mismo, así como formas no protegidas.

Las expresiones "resto separador", "enlace" o "enlazador" se usan en este documento para referirse a un átomo o una colección de átomos usados para enlazar restos de interconexión, tales como un extremo de un polímero y un resto GLP-1 o un electrófilo o nucleófilo de un resto GLP-1. El resto separador puede ser hidrolíticamente estable o puede incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarburo, típicamente que varía de aproximadamente 1 a 15 átomos de longitud. Con frecuencia dichas cadenas hidrocarburo no están necesariamente saturadas y pueden ser cadenas ramificadas o lineales. Es típica la cadena lineal. Los grupos alquilo ejemplares incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Como se usa en este documento, "alquilo" incluye cicloalquilo, así como alquilo que contiene cicloalquileno.

"Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos no limitantes de alquilo inferior incluyen metilo, etilo, n-butilo, i-butilo y t-butilo.

"Cicloalquilo" se refiere a una cadena hidrocarburo cíclica saturada o insaturada, incluyendo compuesto puenteados, condensados o espiro cíclicos, tales como los constituidos de 3 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono. "Cicloalquileno" se refiere a un grupo cicloalquilo que se inserta en una cadena alquilo enlazando la cadena en dos carbonos cualesquiera en el sistema de anillos cíclicos.

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, tales como alquilo C<sub>1-6</sub> (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, y así sucesivamente).

El término "sustituido" como en, por ejemplo, "alquilo sustituido", se refiere a un resto (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como pero sin limitación: alquilo, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, y similares; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo; ciano; alcoxi; fenilo inferior; fenilo sustituido; y similares. "Ariilo sustituido" es ariilo que tiene uno o más sustituyentes no interferentes. Para las sustituciones en un anillo fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta o para).

"Sustituyentes no interferentes" son los grupos que, cuando están presentes en una molécula, son típicamente no reactivos con otros grupos funcionales contenidos en la molécula.

"Ariilo" se refiere a uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 ó 6 átomos de carbono en el núcleo. Ariilo incluye múltiples anillos ariilo que pueden estar condensados, como en el naftilo, o no condensados, como en el bifenilo. Los anillos ariilo también pueden estar condensados o no condensados con uno o más anillos hidrocarburo cíclico, heteroarilo o heterocíclicos. Como se usa en este documento, "ariilo" incluye heteroarilo y heterociclo.

"Heteroarilo" es un grupo ariilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, tales como azufre, oxígeno o nitrógeno, o una combinación de los mismos. Los anillos heteroarilo también pueden estar condensados con uno o más anillos hidrocarburo cíclico, heterocíclico, ariilo o heteroarilo. Como se usa en este documento, "heteroarilo" incluye heteroarilo sustituido.

"Heterociclo" o "heterocíclico" se refiere a uno o más anillos de 5-12 átomos, tales como 5-7 átomos, con o sin carácter de insaturación o aromático y que tienen al menos un átomo en el anillo que es un carbono. Los heteroátomos incluyen, pero sin limitación, azufre, oxígeno y nitrógeno. Como se usa en este documento, "heterociclo" incluye heterociclo sustituido.

"Heteroarilo sustituido" es heteroarilo que tiene uno o más grupo no interferentes como sustituyentes.

"Heterociclo sustituido" es un heterociclo que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes no interferentes.

Un "radical orgánico", como se usa en este documento, incluirá alquilo, alquilo sustituido, ariilo y ariilo sustituido.

"Electrófilo" y "grupo electrófilo" se refieren a un ión o átomo o colección de átomos que pueden ser iónicos, que tienen un centro electrófilo, es decir, un centro que es un aceptor de electrones, capaz de reaccionar con un nucleófilo.

"Nucleófilo" y "grupo nucleófilo" se refieren a un ión o átomo o una colección de átomos que pueden ser iónicos que tienen un centro nucleófilo, es decir, un centro que es aceptor de un centro electrófilo o capaz de reaccionar con un electrófilo.

Una unión o enlace "hidrolíticamente degradable" o "hidrolizable" es un enlace que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. Los ejemplos incluyen enlaces que tienen una semivida de hidrólisis a pH 8, 25 °C de menos de aproximadamente 30 minutos. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo general de unión que conecta dos átomos determinados sino también de los sustituyentes unidos a los dos átomos determinados. Las uniones hidrolíticamente inestables o degradables incluyen, pero sin limitación, carbamato, éster carboxilato (denominado en este documento simplemente como "éster"), éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, péptido y oligonucleótido. Las uniones hidrolíticamente degradables excluyen uniones en las que la escisión de un grupo vehículo se vuelve eficaz sólo después del desenmascaramiento de un grupo de activación, tal como se describe en el documento WO 2005/099768. En otras

palabras, las uniones hidrolíticamente degradables excluyen uniones en base a mecanismos de escisión en cascada.

5 "Unido de forma liberable", por ejemplo, en referencia a un resto GLP-1 unido de forma liberable a un polímero soluble en agua, se refiere a un resto, tal como un resto GLP-1 que se une covalentemente a través de un enlazador que incluye una unión hidrolíticamente degradable como se ha definido anteriormente, en el que tras la hidrólisis, el resto GLP-1 se libera. El resto GLP-1 liberado de este modo corresponderá típicamente al resto GLP-1 de partida no modificado o nativo, o puede alterarse ligeramente, por ejemplo, para que posea un marcador orgánico corto de no más de aproximadamente 8 átomos más o menos, por ejemplo, típicamente resultante de la escisión incompleta del polímero soluble en agua. Preferiblemente, se libera el resto GLP-1 de partida no modificado. En los casos en los que el polímero soluble en agua incluye o está unido covalentemente al resto GLP-1 a través de un enlazador que comprende un grupo arilo, la liberación del resto GLP-1 se da a través de un mecanismo que no implica ni una etapa de eliminación 1,4 ni una etapa de eliminación 1,6.

15 Una "unión enzimáticamente degradable" se refiere a una unión que es sometida a degradación por una o más enzimas.

20 Una unión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, no experimenta hidrólisis en condiciones fisiológicas en ninguna extensión apreciable durante un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de uniones hidrolíticamente estables incluyen, pero sin limitación, los que se indican a continuación: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretano y similares. Generalmente, una unión hidrolíticamente estable es una que muestra una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis de los enlaces químicos representativos pueden encontrarse en muchos de los libros de texto de química.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente en una composición y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos a un paciente tras su administración.

30 Una "composición farmacéutica" es una composición útil para fines farmacéuticos.

Como se usa en este documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que incluye tanto cantidades terapéuticamente eficaces como cantidades profilácticamente eficaces.

35 Como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para conseguir el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica para tratar o mejorar la diabetes es una cantidad suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la diabetes, por ejemplo, una cantidad que sea necesaria para proporcionar un nivel deseado de insulina en el torrente sanguíneo para dar como resultado una reducción de la glucosa en sangre. La cantidad farmacológicamente eficaz de una composición farmacéutica determinada variará con factores, tales como la naturaleza del principio activo en la composición, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que recibe la composición, y el fin de la administración. La cantidad adecuada puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica en base a la bibliografía disponible y la información proporcionada en este documento.

45 Como se usa en este documento, "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para conseguir el resultado profiláctico deseado. Ya que se administra una dosis profiláctica a los pacientes antes de la aparición de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz típicamente es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

50 "Multifuncional" se refiere a un polímero que tiene tres o más grupos funcionales contenidos en el mismo, en el que los grupos funcionales pueden ser los mismos o diferentes. Los reactivos poliméricos multifuncionales contendrán típicamente aproximadamente 3-100 grupos funcionales, o 3-50 grupos funcionales, o 3-25 grupos funcionales, o 3-15 grupos funcionales, o de 3 a 10 grupos funcionales, o contendrán 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales en la estructura polimérica.

55 La expresión "resto GLP-1", como se usa en este documento, se refiere a un resto que tiene actividad del GLP-1. El resto GLP-1 también tendrá al menos un grupo electrófilo o un grupo nucleófilo adecuado para reaccionar con un polímero soluble en agua como se proporciona en este documento. Además, la expresión "resto GLP-1" incluye tanto el resto GLP-1 anterior a la conjugación, así como el residuo del resto GLP-1 tras la conjugación. Como se explicará en más detalle a continuación, un experto en la técnica puede determinar si cualquier resto dado tiene actividad del GLP-1. Como se usa en este documento, la expresión "resto GLP-1" incluye péptidos modificados deliberadamente, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida o accidentalmente a través de mutaciones. La expresión "resto GLP-1" incluye GLP-1 nativo (GLP-1 (7-37)OH o GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>), análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, fragmentos de GLP-1 biológicamente activos, GLP-1 extendido (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO 03/058203, en particular con respecto a los análogos del péptido-1 similar al glucagón extendido descritos en el mismo), y análogos de exendin-4 y derivados de exendin-4 que comprenden uno o más



residuos de cisteína en posiciones particulares en el GLP-1 como se describe en el documento WO 2004/093823.

"GLP-1" se refiere a un compuesto que tiene actividad del GLP-1. Como se usa en este documento, el término "GLP-1" incluye péptidos modificados deliberadamente, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida o accidentalmente a través de mutaciones. El término "GLP-1" incluye GLP-1 nativo (GLP-1 (7-37)OH o GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>), análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, fragmentos de GLP-1 biológicamente activos, GLP-1 extendido (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO 03/058203, en particular con respecto a los análogos del péptido-1 similar al glucagón extendido descritos en el mismo), y análogos de exendin-4 y derivados de exendin-4 que comprenden uno o más residuos de cisteína en posiciones particulares en el GLP-1 como se describe en el documento WO 2004/093823.

El término "fragmento" se refiere a cualquier péptido que tiene la secuencia aminoacídica de una porción de un resto GLP-1 que conserva cierto grado de actividad del GLP-1. Los fragmentos incluyen péptidos producidos por degradación proteolítica del GLP-1 o producidos por síntesis química mediante procedimientos habituales en la técnica. A menudo, los fragmentos de GLP-1 se obtienen después del truncamiento de uno o más aminoácidos del extremo N y/o el extremo C de un resto GLP-1, y poseen un grado de actividad del GLP-1.

El término "sustancialmente homólogo" significa que una secuencia objeto particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía de una secuencia de referencia por una o más sustituciones, deleciones o adiciones, cuyo efecto neto no da como resultado una diferencia funcional adversa entre las secuencias de referencia y objeto. Para los fines de la presente invención, las secuencias que tienen más del 95 por ciento de homología, propiedades biológicas equivalentes (aunque grados de actividad potencialmente diferentes), y características de expresión equivalentes se consideran sustancialmente homólogas. Para los fines de la homología de determinación, no debe tenerse en cuenta el truncamiento de la secuencia madura. Las secuencias que tienen grados menores de homología, bioactividad comparable, y características de expresión equivalentes se consideran sustancialmente equivalentes. Los restos GLP-1 ejemplares para su uso en este documento incluyen los péptidos que tienen una secuencia que es sustancialmente homóloga a, por ejemplo, el GLP-1 nativo.

Una "variante de deleción" de un resto GLP-1 es un péptido en el que uno o más residuos aminoacídicos del resto GLP-1 se han eliminado y los residuos aminoácidos anteriores y posteriores al residuo aminoacídico eliminado se conectan a través de un enlace amida (excepto en casos en los que el residuo aminoacídico eliminado se situó en un extremo del péptido o la proteína). Las variantes de deleción incluyen casos en los que sólo se ha eliminado un residuo aminoacídico, así como casos en los que se eliminan dos aminoácidos, se eliminan tres aminoácidos, se eliminan cuatro aminoácidos, y así sucesivamente. Cada deleción conserva cierto grado de actividad del GLP-1.

Una "variante de sustitución" de un resto GLP-1 es un péptido o proteína en los que se han eliminado uno o más residuos aminoacídicos del resto GLP-1 y un residuo aminoacídico diferente ha tomado su lugar. Las variantes de sustitución incluyen casos en los que sólo se ha sustituido un residuo aminoacídico, así como casos en los que se sustituyen dos aminoácidos, se sustituyen tres aminoácidos, se sustituyen cuatro aminoácidos, y así sucesivamente. Cada variante de sustitución tiene cierto grado de actividad del GLP-1.

Una "variante de adición" de un resto GLP-1 es un péptido en el que se han añadido uno o más residuos aminoacídicos del GLP-1 en una secuencia aminoacídica, y se unen residuos aminoacídicos adyacentes al residuo aminoacídico añadido por medio de enlaces amida (excepto en casos en los que el residuo aminoacídico añadido se sitúa en un extremo del péptido, en el que sólo un único enlace amida se une al resto aminoacídico añadido). Las variantes de adición incluyen casos en los que se ha añadido sólo un único residuo aminoacídico, así como casos en los que se añaden dos aminoácidos, se añaden tres aminoácidos, se añaden cuatro aminoácidos, y así sucesivamente. Cada variante de adición tiene cierto grado de actividad del GLP-1.

"Actividad insulínica" se refiere a la capacidad de estimular la secreción de insulina en respuesta a niveles de glucosa elevados, causando de este modo la captación de glucosa por las células y un descenso en los niveles de glucosa en plasma. La actividad insulínica puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como midiendo la actividad de unión del receptor de GLP-1 o la activación, por ejemplo, ensayos que emplean células de los islotes pancreáticos o células de insulinoma, como se describe en el documento EP 619 322 y la Patente de Estados Unidos N° 5.120.712, respectivamente. La actividad insulínica se mide típicamente en los seres humanos midiendo los niveles de insulina o del péptido C.

Las expresiones "sujeto", "individuo" o "paciente" se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, murinos, roedores, simios, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancias que se describe posteriormente puede o no ocurrir, de manera que la descripción incluya casos en los que la circunstancia ocurra y casos en los que no.

"Sustancialmente" (a menos que se define específicamente para un contexto particular en otro lugar o el contexto indique claramente otra cosa) se refiere a casi totalmente o completamente, por ejemplo, satisfaciendo uno o más de

los siguientes casos: más del 50%, el 51% o más, el 75% o más, el 80% o más, el 90% o más, y el 95% o más de la condición.

5 A menos que el contexto indique claramente otra cosa, cuando el término "aproximadamente" preceda un valor numérico, se entiende que el valor numérico se refiere a  $\pm 10\%$  del valor numérico indicado.

10 "Aminoácido" se refiere a cualquier compuesto que contenga tanto un grupo amino como un grupo ácido carboxílico. Aunque el grupo amino aparece más comúnmente en la posición adyacente a la función carboxi, el grupo amino puede situarse en cualquier ubicación en la molécula. El aminoácido también puede contener grupos funcionales adicionales, tales como amino, tio, carboxilo, carboxamida, imidazol, etc. Un aminoácido puede ser sintético o de origen natural, y puede usarse en su forma racémica u ópticamente activa (D o L).

15 Los residuos aminoacídicos en los péptidos se abrevian como se indica a continuación: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G.

20 Una "composición de liberación sostenida" o una "composición de liberación prolongada" es una composición que libera el principio activo lentamente durante un periodo de tiempo relativamente mayor que una composición de "liberación inmediata". En general, el principio activo, por ejemplo, el conjugado polimérico de GLP-1, se libera durante al menos aproximadamente 3 horas, o al menos aproximadamente 4 horas, o al menos aproximadamente 5 horas, o al menos aproximadamente 6 horas, o al menos aproximadamente 8 horas.

25 Un "nivel en plasma sostenido" de una proteína durante un periodo de tiempo especificado que la proteína puede detectarse en el plasma durante una duración especificada. Una proteína puede detectarse mediante cualquier procedimiento para detectar dicha proteína, por ejemplo, procedimientos inmunológicos, bioquímicos o funcionales. Por ejemplo, la insulina puede detectarse mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), espectrometría de masas, o determinación de los niveles de glucosa en sangre.

30 Una composición que es "adecuada para su administración pulmonar" se refiere a una composición que es capaz de aerosolizarse e inhalarse por un sujeto para que una porción de las partículas aerosolizadas alcance los pulmones para permitir la penetración en los alveolos. Una composición de este tipo puede considerarse "respirable" o "inhalable".

35 Una composición "aerosolizada" contiene partículas líquidas o sólidas que están suspendidas en un gas (típicamente aire), típicamente como resultado de la activación (o disparo) de un dispositivo de inhalación, tal como un inhalador de polvo, un atomizador, un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

40 Un "nebulizador de chorro" es un sistema, tal como un dispositivo, que impulsa aire comprimido a través de una solución de un fármaco para que pueda administrarse una pulverización fina a una máscara facial y se inhale. Los nebulizadores a menudo se usan para administrar fármacos a quienes carecen de la capacidad de usar un inhalador de dosis medida o activado por la respiración.

45 Un "inhalador de polvo seco" es un dispositivo que se carga con una dosificación unitaria del fármaco en forma de polvo. Generalmente, el inhalador se activa respirando. Por ejemplo, una cápsula o blister se perfora y el polvo se dispersa para que pueda inhalarse en, por ejemplo, un "Spinhaler" o un "Rotahaler". Los "Turbohalers" se equipan con cartuchos que administran dosis medidas del fármaco en forma de polvo.

50 Un "inhalador de dosis medida" o "IDM" es un dispositivo que administra una dosis medida de un fármaco en forma de una suspensión de partículas líquidas o sólidas extremadamente pequeñas, que se dispensa del inhalador por un propulsor a presión. Dichos inhaladores se colocan en la boca y se oprimen (activan) para liberar el fármaco según el individuo respira.

55 Como se usa en este documento, la expresión "dosis emitida" o "DE" se refiere a una indicación de la administración de polvo seco de un dispositivo inhalador después de un acontecimiento de activación o dispersión de una unidad o depósito de polvo. La DE se define como la proporción de la dosis administrada por un dispositivo inhalador con respecto a la dosis nominal (es decir, la masa del polvo por dosis unitaria colocada en un dispositivo inhalador adecuado anterior al disparo). La DE es una cantidad experimentalmente determinada, y puede determinarse  
60 usando una configuración del dispositivo *in vitro* que imita la dosificación del paciente. Para determinar un valor de la DE, como se usa en este documento, el polvo seco se coloca en un dispositivo de un Sistema de Administración Pulmonar (PDS) (Nektar Therapeutics), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.257.233. El dispositivo PDS se activa, lo que dispersa el polvo. Después, la nube de aerosol resultante se extrae del dispositivo al vacío (30 l/min) durante 2,5 segundos después de la activación, donde se captura en un filtro de fibra de vidrio tarado  
65 (Gelman, 47 mm de diámetro) unido a la boquilla del dispositivo. La cantidad de polvo que alcanza el filtro constituye la dosis administrada. Por ejemplo, para un blister que contiene 5 mg de polvo seco que se coloca en un dispositivo

de inhalación, si la dispersión del polvo da como resultado la recuperación de 4 mg de polvo en un filtro tarado como se ha descrito anteriormente, entonces la DE para la composición de polvo seco es del 80% (= 4 mg (dosis administrada)/5 mg (dosis nominal)).

- 5 Una composición en "forma de polvo seco" es una composición en polvo que contiene típicamente menos de aproximadamente el 20% en peso, menos de aproximadamente el 10% en peso, o menos de aproximadamente el 5% en peso, de agua.

10 Como se usa en este documento, "diámetro medio de masa" o "DMM" se refiere al diámetro medio de una pluralidad de partículas, típicamente en una población de partículas polidispersas, es decir, que consiste en un intervalo de tamaños de partícula. Los valores del DMM como se indican en este documento se determinan por difracción láser (Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Alemania), a menos que el contexto indique otra cosa. Típicamente, las muestras de polvo se añaden directamente al embudo alimentador de la unidad de dispersión de polvo seco Sympatec RODOS. Esto puede conseguirse manualmente o mediante agitación mecánica del extremo de un elemento alimentador vibratorio VIBRI. Las muestras se dispersan a partículas primarias a través de la aplicación de aire presurizado (de 2 a 3 bar), con depresión al vacío (succión) maximizada para una presión de dispersión determinada. Las partículas dispersadas se sondan con un haz de láser de 632,8 nm que cruza la trayectoria de las partículas dispersadas en ángulos rectos. La luz láser dispersada desde el conjunto de partículas se toma en imágenes sobre una matriz concéntrica de elementos detectores fotomultiplicadores usando un conjunto de lentes de Fourier inversa. La luz dispersada se adquiere en segmentos de tiempo de 5 ms. Las distribuciones de los tamaños de partícula se calculan de nuevo a partir de la distribución espacial de la luz dispersada/intensidad usando un algoritmo.

25 "Diámetro medio de masa aerodinámico", o "DMMA", es una medida del tamaño aerodinámico de una partícula dispersada. El diámetro aerodinámico se usa para describir un polvo aerosolizado en cuando a su comportamiento de sedimentación, y es el diámetro de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación, en aire, que la partícula. El diámetro aerodinámico incluye la forma de la partícula, la densidad y el tamaño físico de una partícula. Como se usa en este documento, el DMMA se refiere al punto medio o media de la distribución del tamaño de partícula aerodinámico de un polvo aerosolizado determinado por el impacto en cascada en condiciones convencionales usando un dispositivo de un Sistema de Administración Pulmonar (PDS) (NektarTherapeutics), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.257.233, a menos que se indique otra cosa.

35 La "fracción de partículas finas" es la fracción de partículas con un diámetro aerodinámico que es menor de 5 micrómetros. Cuando se especifique, la fracción de partículas finas también puede referirse a la fracción de partículas con un diámetro aerodinámico que es menor de 3,3 micrómetros.

40 "Tratar o mejorar" una enfermedad o afección médica significa reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o la afección médica. En algunas realizaciones, "tratar o mejorar" una enfermedad o afección médica se dirigirá a abordar la causa de la causa de la enfermedad o afección médica. El tratamiento de una enfermedad puede dar como resultado la cura de la enfermedad.

45 "Insulina basal" se refiere a una insulina de acción prolongada que es suficiente para mantener constantes los bajos niveles de insulina eficaces para satisfacer los requerimientos basales. Generalmente, una insulina basal es una que muestra un tiempo de acción prolongado de más de aproximadamente 8 horas en un modelo convencional de diabetes. Las insulinas basales disponibles en el mercado incluyen neutral protamina Hagedorn (NPH), Lente, y Ultralente - y análogos, tales como insulina glargina.

50 Un conjugado polimérico de GLP-1 que carece de bioactividad es uno que, cuando se evalúa en un ensayo apto para la evaluación de la bioactividad del GLP-1, posee una bioactividad de menos de aproximadamente el 2% en comparación con el GLP-1 nativo. Pueden usarse diversos ensayos para evaluar la bioactividad, incluyendo ensayos *in vitro* e *in vivo* que miden la actividad de unión al receptor de GLP-1 o la activación del receptor, como se describe en más detalle en este documento. También puede usarse un ensayo de señalización de receptor para evaluar la actividad del GLP-1 (véase, por ejemplo, Zlokarnik y col., Science, 1998, 279: 84-88).

55 Un "monómero" o "mono-conjugado", en referencia a un conjugado polimérico de GLP-1, se refiere a un resto GLP-1 que tiene sólo una molécula polimérica soluble en agua unida covalentemente al mismo, mientras que un "dímero" o "diconjugado" de GLP-1 es un conjugado polimérico de GLP-1 que tiene dos moléculas poliméricas solubles en agua unidas covalentemente al mismo, y así sucesivamente.

60 Volviendo ahora a uno o más aspectos de la presente invención, se proporcionan los conjugados, comprendiendo los conjugados típicamente un resto GLP-1 unido de forma liberable, directamente a través de una unión hidrolizable o a través de un enlazador que comprende una unión hidrolizable, a un polímero soluble en agua. Los conjugados de la invención, cuando se administran *in vivo*, son normalmente eficaces no sólo al proporcionar una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre, sino por haber demostrado poseer propiedades de liberación prolongada. Es decir, la capacidad de reducir la glucosa en sangre de los presentes conjugados es eficaz típicamente durante una duración de horas, y en algunos casos, días, a diferencia del aclaramiento rápido y la corta

actividad del GLP-1 nativo. Por lo tanto, los conjugados de la invención típicamente proporcionan varias ventajas notables sobre el GLP-1 nativo. Finalmente, a pesar de que se ha sugerido que la modificación N-terminal de GLP-1 es ineficaz para proporcionar un derivado de GLP-1 apto para su uso farmacéutico, véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO 04/078777, la presente invención proporciona, en un aspecto, conjugados poliméricos solubles en agua modificados en el extremo N que no son sólo eficaces, sino que además poseen varias ventajas sobre el GLP-1 nativo, que se describen en más detalle más adelante.

#### El resto GLP-1

Los conjugados de la invención comprenden un resto GLP-1. Como se ha indicado previamente, la expresión "resto GLP-1" se refiere a que incluye el resto GLP-1 anterior a la conjugación, así como después de la unión a uno o más polímeros solubles en agua. Sin embargo, se entenderá que cuando el resto GLP-1 está unido covalentemente a un polímero soluble en agua, el resto GLP-1 se altera ligeramente debido a la presencia de uno o más enlaces covalentes asociados con la unión al polímero (o enlazador que está unido al polímero), debido a la reacción de uno o más grupos reactivos del resto GLP-1 (por ejemplo, un amino, carboxilo, etc.), con el polímero soluble en agua. A menudo, esta forma ligeramente alterada del resto GLP-1 unido a otra molécula, tal como un polímero soluble en agua, se denomina como un "residuo" del resto GLP-1.

Un resto GLP-1 para su uso en la invención es cualquier resto GLP-1 que tiene actividad del GLP-1. Se han descrito previamente numerosos análogos, derivados y variantes de GLP-1, y se incluyen por la expresión "resto GLP-1". Un resto GLP-1 preferido para su uso en la invención es GLP-1 humano, un péptido de 37 aminoácidos. Sus formas de origen natural incluyen GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>, GLP-1 (7-37)OH y GLP-1 (7-37)NH<sub>2</sub>, en las que, de acuerdo con la numeración convencional, la histidina N-terminal se asigna como residuo 7. Las formas disponibles en el mercado también incluyen GLP-1 (1-36).

La secuencia aminoacídica de GLP-1 (7-36) corresponde a: (SEC ID N°: 1)

His7-Ala8-Glu9-Gly10-Thr11-Phe12-Thr13-Ser14-Asp15-Val16-Ser17-Ser18-Tyr19-Leu20-Glu21-Gly22-Gln23-Ala24-Ala25-Lys26-Glu27-Phe28-Ile29-Ala30-Trp31-Leu32-Val33-Lys34-Gly35-Arg36

La secuencia aminoacídica de GLP-1 (7-37)OH corresponde a: (SEC ID N°: 2)

His7-Ala8-Glu9-Gly10-Thr11-Phe12-Thr13-Ser14-Asp15-Val16-Ser17-Ser18-Tyr19-Leu20-Glu21-Gly22-Gln23-Ala24-Ala25-Lys26-Glu27-Phe28-Ile29-Ala30-Trp31-Leu32-Val33-Lys34-Gly35-Arg36-Gly37

Los restos GLP-1 adicionales para su uso en la invención incluyen análogos peptídicos de GLP-1, tales como los descritos en el documento WO 91/11457, fragmentos truncados N-terminal de GLP-1 como se describe en el documento EP 0699686, y secuencias de GLP-1 insertado en cisteína como se describe en el documento WO 2004/093823, entre otros. Las variantes de GLP-1 insertado en cisteína para su uso en la invención incluyen las que tienen una cisteína insertada en las posiciones seleccionadas entre el aminoácido 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 34, 35, 36 y 37 de GLP-1. Dichas variantes se denominan típicamente como se indica a continuación. Por ejemplo, una variante de GLP-1 que tiene una cisteína insertada en las posiciones 22 y 35 se describe típicamente como [Cys<sup>22</sup>Cys<sup>35</sup>]GLP-1 (7-37). Las variantes para su uso en la preparación de un conjugado de la invención a menudo no tienen más de 1 ó 2 aminoácidos de cisteína por resto GLP-1. Las localizaciones ejemplares para la inserción de una cisteína incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 22, 26, 34, 35, 36 y 37 de GLP-1. Dichos restos GLP-1 son particularmente útiles para la conjugación a un reactivo polimérico selectivo de tiol, tal como un polímero soluble en agua que tiene uno o más grupos funcionales de maleimida reactiva.

Otros restos GLP-1 adecuados para su uso en la invención incluyen restos GLP-1 que se describen en la Solicitud Publicada de Estados Unidos N° 2004/0235710, que corresponde al N° de Serie 10/486.333.

Además, para su uso en la presente invención son análogos de GLP-1 denominados exendinas. Las exendinas son péptidos que se aislaron en primer lugar de las secreciones salivales del monstruo de Gila y el Lagarto Moteado Mejicano. Las exendinas tienen un grado de similitud a varios miembros de la familia GLP, con la homología más alta, el 53%, para GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> (Goke, y col., J. Biol. Chem., 268: 19650-55, 1993).

Las exendinas particulares para su uso en la presente invención incluyen exendin-3 y exendin-4 (la extendin-4 sintética también se conoce como Exenatida).

La exendin-3 (1-39) tiene la siguiente secuencia aminoacídica: (SEC ID N°: 3)

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe He Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

La secuencia aminoacídica de exendin-4 (1-39) corresponde a: (SEC ID N°: 4)

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe He Glu Trp Leu Lys Asn  
Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

en la que la serina C-terminal está amidada.

5 El resto GLP-1 puede obtenerse a partir de procedimientos no recombinantes o a partir de procedimientos recombinantes, y la invención no está limitada en este sentido. Además, están disponibles en el mercado varios restos GLP-1, por ejemplo, hGLP-1, rExendin-4 y rHuGLP-1 están disponibles en ProSpecTany Techno Gene LTD (Rehovot, Israel); y (Ser8)GLP-1 (7-36)amida, hGLP-1 amida, hGLP-1 (7-36)Lys(biotina)amida, (American Peptide Co., Sunnyvale, CA), entre otros. Se conocen bien procedimientos para preparar restos GLP-1, y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.118.666; 5.120.712; y 5.523.549.

15 Pueden prepararse restos GLP-1 usando procedimientos convencionales de síntesis peptídica en solución o fase sólida, tales como los descritos en Dugas H., Penny, C, *Bioorganic Chemistry*, Springer Verlag, Nueva York, pág. 54-92 (1981); Merrifield, J.M., Chem Soc, 85, 2149 (1962), y Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco, pág. 24-66 (1969). Los sintetizadores peptídicos están disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA. Los sintetizadores de fase sólida se usan típicamente de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes para bloquear grupos interferentes, protegiendo ciertos aminoácidos, acoplando, desacoplando y protegiendo aminoácidos sin reaccionar. Están disponibles en el mercado BOC-aminoácidos y otros reactivos en Applied Biosystems. Como ejemplo no limitante, se aplican protocolos de acoplamiento doble que usan química secuencial BOC a las resinas de p-metil benzhidril amina de partida para la producción de carboxamidas C-terminales. Para la producción de ácidos C-terminales, se usa la reina de PAM correspondiente. Asn, Gin y Arg se acoplan usando hidroxibenzotriazol ésteres preformados. Los grupos protectores de cadena lateral adecuados incluyen: Arg (tosilo), Asp (ciclohexilo), Glu (ciclohexilo), Ser (bencilo), Thr (bencilo) y Tyr (4-bromocarbobenzoxi). La desprotección BOC puede realizarse con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno. Tras la síntesis, el péptido resultante puede desprotegerse y escindir en la resina usando, por ejemplo, HF anhidro que contiene meta-cresol al 10%.

30 Los procedimientos recombinantes ejemplares usados para preparar un resto GLP-1 (ya sea un GLP-1 humano o una proteína diferente que tenga actividad del GLP-1) incluyen los que se indican más adelante, entre otros, como será evidente para un experto en la técnica. Típicamente, un resto GLP-1 como se describe en este documento se prepara construyendo el ácido nucleico que codifica el polipéptido o el fragmento deseado, clonando el ácido nucleico en un vector de expresión, transformando una célula huésped (por ejemplo, planta, bacterias, tales como *Escherichia coli*, levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, o células de mamíferos, tales como célula de ovario de hámster chino o célula de riñón de hámster neonato), y expresando el ácido nucleico para producir el polipéptido o fragmento deseado. La expresión puede ocurrir a través de la expresión exógena (cuando la célula huésped contiene de forma natural el código genético deseado) o a través de la expresión endógena. Se conocen procedimientos para producir y expresar polipéptidos recombinantes *in vitro* y en células huésped procariotas y eucariotas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.868.122.

40 Para facilitar la identificación y la purificación del polipéptido recombinante, pueden insertarse secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador de epítipo u otra secuencia de afinidad de unión o puede añadirse en el marco con la secuencia codificante, produciendo de esta manera una proteína de fusión que comprende el polipéptido deseado y un polipéptido adecuado para la unión. Las proteínas de fusión pueden identificarse y purificarse por primera vez desarrollando una mezcla que contiene la proteína de fusión a través de una columna de afinidad que tiene restos de unión (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos contra el marcador de epítipo u otra secuencia de unión en las proteínas de fusión, uniendo de esta manera la proteína de fusión en la columna. A partir de entonces, la proteína de fusión puede recuperarse lavando la columna con la solución apropiada (por ejemplo, ácido) para liberar la proteína de fusión unida. El polipéptido recombinante también puede identificarse y purificarse lisando las células huésped, separando el polipéptido, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño, y recogiendo el polipéptido. Se conocen estos y otros procedimientos para identificar y purificar los polipéptidos recombinantes por los expertos en la técnica. En una o más realizaciones de la presente invención, el resto GLP-1 no está en forma de una proteína de fusión. Véase, por ejemplo, Dillon y col., Cloning and Functional Expression of the Human Glucagon-Like Peptide-1 Receptor, *Endocrinology*, 133: 1907-1910 (1993).

55 Para cualquier resto dado, es posible determinar si ese resto posee actividad del GLP-1. Pueden usarse diversos ensayos para evaluar la bioactividad, incluyendo ensayos *in vitro* e *in vivo* que miden la actividad de unión al receptor de GLP-1 o la activación del receptor. Véase, por ejemplo, el documento EP 619 322 y la Patente de Estados Unidos N° 5.120.712 para obtener descripciones sobre la evaluación de la actividad del GLP-1. También puede usarse un ensayo de señalización del receptor para evaluar la actividad del GLP-1, tal como se describe en Zlokarnik y col., *Science*, 279, 84-88, 1998.

65 También pueden usarse otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para determinar si un resto determinado tiene actividad del GLP-1. Dichos procedimientos son útiles para determinar la actividad del GLP-1 tanto del propio resto (y por lo tanto pueden usarse como un "resto GLP-1"), así como la del conjugado polímero-resto correspondiente. Por ejemplo, se puede determinar si un resto determinado es un agonista del receptor de

GLP-1 humano evaluando si ese resto estimula la formación de cAMP en un medio adecuado que contiene el receptor de GLP-1 humano. La potencia de dicho resto se determina calculando el valor CE<sub>50</sub> de una curva dosis-respuesta. Como ejemplo, las células BHK (células de riñón de hámster neonato) que expresan el receptor de GLP-1 humano clonado pueden cultivarse en medio DMEM que contiene penicilina, estreptomycin, suero de ternera y Geneticina. Después, las células se lavan en solución salina tamponada con fosfato y se recuperan. Después, se preparan membranas plasmáticas de las células por homogenización, y después el homogenado se centrifuga para producir un gránulo. El gránulo resultante se suspende por homogenización en un tampón adecuado, se centrifuga y después se lava. Después, el ensayo del receptor cAMP se realiza midiendo el AMP cíclico (cAMP) en respuesta al resto insulínico de prueba. El cAMP puede cuantificarse usando el kit de cAMP AlphaScreen™ (Perkin Elmer). Las incubaciones se realizan típicamente en placas de microtitulación en tampón, además de, por ejemplo, ATP, GTP, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, Tween-20, BSA, lechos aceptores, y lechos donantes incubados con -cAMP biotinilado. El recuento puede realizarse, por ejemplo, usando el instrumento Fusion™ (Perkin Elmer). Después, las curvas de concentración-respuesta se representan para los restos insulínicos individuales bajo evaluación, y se determinan sus valores de CE<sub>50</sub>.

Los ejemplos no limitantes de restos GLP-1 incluyen cualquiera de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3; y SEC ID N°: 4; versiones truncadas de los mismos; variantes híbridas, y péptidos miméticos que tienen actividad del GLP-1. Los fragmentos biológicamente activos, las variantes de delección, las variantes de sustitución o las variantes de adición de cualquiera de los anteriores que mantienen al menos cierto grado de actividad del GLP-1 también pueden servir como un resto GLP-1 en los conjugados de la invención.

#### Modificaciones del GLP-1

Un resto GLP-1 como se describe en este documento también puede contener una o más modificaciones adicionales, por ejemplo, la introducción de uno o más glucósidos, o grupos metilo.

#### Metilación

Un resto GLP-1 también puede poseer uno o más grupos metilo u otros grupos alquilo inferior en una o más posiciones de la secuencia de GLP-1. Los ejemplos de tales grupos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, etc. Los sitios de modificación incluyen los residuos 7, 8, 9 y/o 10, prefiriéndose las posiciones 7 y/o 9. Se espera que la introducción de uno o más grupos metilo modifique el sitio de reconocimiento de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), de tal forma que el GLP-1 protegido se protege frente a la degradación por DPP IV. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la N-metilación en posiciones distintas de 7, 8, 9 y/o 10 pueden alterar la helicidad de GLP-1 y reducir de esta manera su actividad.

La introducción de modificaciones de N-terminal a GLP-1 puede realizarse como se describe por Gallwitz, B., y col., Regulatory Peptides, 86 (1-3), 103-111 (2000) o el documento WO 2004/007427. Los análogos de GLP-1 ilustrativos con alteraciones en el extremo N incluyen GLP-1 N-metilado (N-me-GLP-1), GLP-1 alfa-metilado (alfa-me-GLP-1), GLP-1 desamidado (desamino-GLP-1) y GLP-1 sustituido con imidazol-ácido láctico (imi-GLP-1), entre otros, y son adecuados para su uso en la presente invención.

Se describen procedimientos para sintetizar diversos análogos diferentes de GLP-1, incluyendo derivados de metilo como se ha descrito anteriormente, y también ejemplos de dichos análogos de GLP-1 adicionales en las Publicaciones de Patente Internacional WO 00/34332, WO 2004/074315 y WO 2005/058955.

#### Glucosilación

Los restos GLP-1 descritos en este documento también pueden contener uno o más glucósidos. Aunque puede usarse cualquier glucósido, el resto GLP-1 está modificado preferiblemente por la introducción de un monosacárido, un disacárido o un trisacárido. Aunque puede modificarse cualquier sitio en el resto GLP-1 por la introducción de un sacárido, preferiblemente, el sacárido se introduce en una cualquiera o más de las posiciones 7, 8 ó 9 para proteger el péptido frente a la proteólisis de DPP IV. Además, pueden introducirse más glucósidos, por ejemplo, en una cualquiera o más de las posiciones 11, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26 y 34 para aumentar la helicidad a través de la porción central del péptido, así como proporcionar resistencia adicional a la proteólisis. La glucosilación puede darse en un aminoácido de origen natural. Como alternativa, un sacárido puede unirse covalentemente a uno o más sitios del resto GLP-1, en el que cada uno o más sitios comprende uno de Asp, Asn, Ser y Thr que está sustituido en uno o más sitios seleccionados entre el extremo N (His7), Ala8, Glu9, Thr11, Thr13, Ser14, Ser17, Ser18, Glu21, Gly22, Gln23, Lys26 y Lys34.

Los restos GLP-1 glucosilados pueden prepararse usando técnicas de síntesis peptídica de química Fmoc y de fase sólida convencionales, por ejemplo, sobre resina, en los que los glicaminoácidos protegidos deseados se preparan antes de la síntesis peptídica y después se introducen en la cadena peptídica en la posición deseada durante la síntesis peptídica. Por lo tanto, los conjugados poliméricos de GLP-1 pueden conjugarse *in vitro*. La glucosilación puede darse antes de la desprotección. La preparación de glucósidos aminoácidos se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.767.254, el documento WO 2005/097158, y Doores, K., y col., Chem. Commun., 1401-1403,

2006. Por ejemplo, las glucosilaciones alfa y beta selectivas de residuos de serina y treonina se realizan usando la reacción de Koenigs-Knorr y la metodología de anomerización de Lemieux *in situ* con intermedios de base Schiff. Después, la desprotección del glucósido de base Schiff se realiza usando condiciones ligeramente ácidas o de hidrogenólisis. Una composición, que comprende un conjugado de GLP-1 glucosilado y pegilado preparado por síntesis peptídica de fase sólida por etapas que implica poner en contacto una cadena peptídica creciente con aminoácidos protegidos por etapas, en la que al menos uno de los aminoácidos protegidos está glucosilado, seguido de pegilación, puede tener una pureza de al menos aproximadamente el 95%, tal como al menos aproximadamente el 97%, o al menos aproximadamente el 98%, de una sola especie del conjugado de GLP-1 glucosilado y pegilado.

Los monosacáridos que pueden usarse para su introducción en uno o más residuos aminoácidos de GLP-1 incluyen glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa y ribosa. Los monosacáridos adicionales adecuados para su uso incluyen gliceraldehídos, dihidroxiacetona, eritrosa, treosa, eritrosa, arabinosa, lixosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, mannososa, así como otros. Los glucósidos, tales como mono-, di- y trisacáridos para su uso en la modificación de un resto GLP-1, pueden ser de origen natural o pueden ser sintéticos.

Los disacáridos que pueden usarse para su introducción en uno o más residuos aminoácidos de GLP-1 incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, melibiosa y celobiosa, entre otros. Los trisacáridos incluyen acarbossa, rafinosa y melezitosa.

#### El polímero soluble en agua

Un conjugado de la invención comprende un resto GLP-1 unido, preferiblemente, pero no necesariamente liberable, a un polímero soluble en agua. El polímero soluble en agua es típicamente hidrófilo, no peptídico, no tóxico, de origen sintético y biocompatible. Una sustancia se considera biocompatible si los efectos beneficiosos relacionados con el uso de la sustancia sola o con otra sustancia (por ejemplo, un agente activo, tal como un resto GLP-1) junto con tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) supera cualquier efecto destructivo que se evalúe por un médico, por ejemplo, un especialista. Una sustancia se considera no inmunogénica si el uso deseado de la sustancia *in vivo* no produce una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmune, de tal forma que una respuesta de este tipo no se considere clínicamente significativa o importante como se evalúa por un médico. Típicamente, el polímero soluble en agua es hidrófilo, biocompatible y no inmunogénico.

Además, el polímero soluble en agua se caracteriza típicamente por tener de 2 a aproximadamente 300 extremos, preferiblemente de 2 a 100 extremos, y más preferiblemente de aproximadamente 2 a 50 extremos. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen, pero sin limitación, poli(alquilenglicoles), tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli( $\alpha$ -ácido hidroxilo), poli(alcohol polivinílico), polifosfazeno, polioxazolona, poli(N-acrilolmorfolina), y combinaciones de cualquiera de los anteriores, incluyendo copolímeros y terpolímeros de los mismos.

El polímero soluble en agua no se limita a una estructura particular y puede poseer una arquitectura lineal (por ejemplo, alcoxi PEG o PEG bifuncional), o una arquitectura no lineal, tal como ramificada, bifurcada, multi-ramificada (por ejemplo, PEG unidos a un núcleo polioli), o dendrítica. Además, las subunidades poliméricas pueden organizarse en cualquier número de patrones diferentes y pueden seleccionarse, por ejemplo, entre homopolímero, copolímero alternado, copolímero aleatorio, copolímero de bloques, tripolímero alternado, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloques.

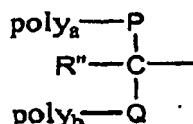
Un tipo de polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso en la invención es un óxido de polialquileño, y en particular, polietilenglicol (o PEG). Generalmente, un PEG usado para preparar un conjugado polimérico de GLP-1 de la invención está "activado" o es reactivo. Es decir, el PEG activado (y otros polímeros solubles en agua activados denominados en conjunto en este documento como "reactivos poliméricos") usado para formar un conjugado de GLP-1 comprende un grupo funcional activado adecuado para acoplarse a un sitio o sitios deseados en el resto GLP-1. Por lo tanto, un reactivo polimérico para su uso en la preparación de un conjugado de GLP-1 incluye un grupo funcional para la reacción con el resto GLP.

Se conocen en la técnica reactivos poliméricos representativos y procedimientos para conjugar dichos polímeros a un resto activo, y se describen, por ejemplo, en Harris, J.M. y Zalipsky, S., eds, *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS, Washington, 1997; Veronese, F., y J.M Harris, eds., *Peptide and Protein PEGylation*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4); 453-609 (2002); Zalipsky, S., y col., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, ed., Plenus Press, Nueva York (1992); Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews*16: 157-182, y en Roberts, y col., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 54, 459-476 (2002).

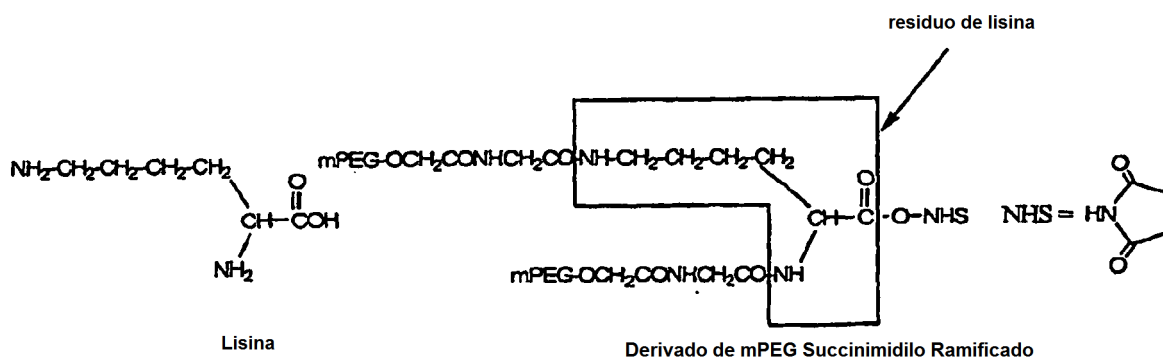
Se describen reactivos de PEG adicionales adecuados para su uso en la formación de un conjugado de la invención, y procedimientos de conjugación en los Nektar Advanced PEGylation Catalogs, 2005-2006; 2004; 2003; y en Shearagua Corporation, Catalog 2001; Shearagua Polymers, Inc., Catalogs, 2000 y 1997-1998, y en Pasut. G., y

col., *Expert Opin. Ther. Patents* (2004), 14(5). Los reactivos de PEG adecuados para su uso en la presente invención también incluyen los disponibles en NOF Corporation, como se describe generalmente en el sitio web de NOF (2006) en Products, High Purity PEGs and Activated PEGs. Los productos enumerados en el mismo y sus estructuras químicas se incorporan expresamente en este documento por referencia. Los PEG adicionales para su uso en la formación de un conjugado de GLP-1 de la invención incluyen los disponibles en Polypure (Noruega) y en QuantaBioDesign LTD (Ohio).

Las moléculas de PEG multi-ramificadas o ramificadas, tales como las descritas en Patente de Estados Unidos N° 5.932.462, también son adecuadas para su uso en la presente invención. Por ejemplo, el PEG puede describirse en general de acuerdo con la estructura:

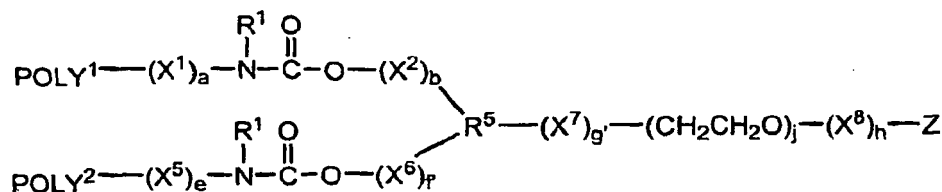


en la que poly<sub>a</sub> y poly<sub>b</sub> son cadenas principales de PEG (iguales o diferentes), tales como metoxi poli(etilenglicol); R'' es un resto no reactivo, tal como H, metilo o una estructura de PEG; y P y Q son uniones no reactivas. En una realización, la molécula de PEG ramificada es una que incluye un residuo de lisina, tal como el siguiente PEG reactivo adecuado para su uso en la formación de un conjugado de GLP-1. Véase, por ejemplo, el Shearagua Corporation Catalog, 2001, página 6. Aunque el PEG ramificado que se indica a continuación se muestra con un grupo reactivo de succinimidilo, sólo representa uno de una miríada de grupos reactivos funcionales adecuados para reaccionar con un resto GLP-1.



En algunos casos, el reactivo polimérico (así como el conjugado correspondiente preparado a partir del reactivo polimérico) puede carecer de un residuo de lisina en el que las porciones poliméricas se conectan a los grupos amina de la lisina a través de un grupo "-OCH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CO-". En aún otros casos, el reactivo polimérico (así como el conjugado correspondiente preparado a partir del reactivo polimérico) puede carecer de un polímero soluble en agua ramificado que incluya un residuo de lisina (en el que el residuo de lisina se usa para realizar la ramificación).

Los PEG ramificados adicionales para su uso en la formación de un conjugado de GLP-1 de la presente invención incluyen los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos en copropiedad N° 2005/0009988. Los polímeros ramificados representativos descritos en la misma incluyen los que tienen la siguiente estructura generalizada:

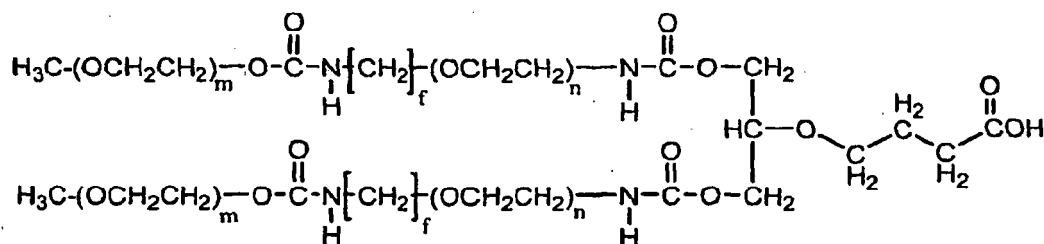


en la que POLY<sup>1</sup> es un polímero soluble en agua; POLY<sup>2</sup> es un polímero soluble en agua; (a) es 0, 1, 2 ó 3; (b) es 0, 1, 2 ó 3; (e) es 0, 1, 2 ó 3; (f) es 0, 1, 2 ó 3; (g) es 0, 1, 2 ó 3; (h) es 0, 1, 2 ó 3; (j) es de 0 a 20; cada R<sup>1</sup> es independientemente H o un radical orgánico seleccionado entre alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo



sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo y arilo sustituido; X<sup>1</sup>, cuando está presente, es un resto separador; X<sup>2</sup>, cuando está presente, es un resto separador; X<sup>5</sup>, cuando está presente, es un resto separador; X<sup>6</sup>, cuando está presente, es un resto separador; X<sup>7</sup>, cuando está presente, es un resto separador; X<sup>8</sup>, cuando está presente, es un resto separador; R<sup>5</sup> es un resto de ramificación; y Z es un grupo reactivo para el acoplamiento a un resto GLP-1, opcionalmente a través de un separador de intervención. POLY<sup>1</sup> y POLY<sup>2</sup> en la estructura polimérica ramificada anterior pueden ser diferentes o idénticos, es decir, son del mismo tipo de polímero (estructura) y peso molecular.

Un polímero ramificado preferido que está dentro de la clasificación anterior adecuado para su uso en la presente invención es:



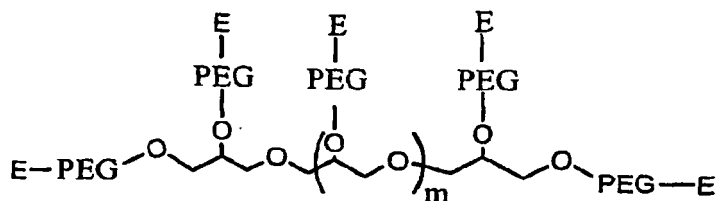
en el que (m) es de 2 a 4000, y (f) es de 0 a 6 y (n) es de 0 a 20.

Los polímeros ramificados adecuados para preparar un conjugado de la invención también incluyen los representados más generalmente por la fórmula R(POLY)<sub>y</sub>, en la que R es una molécula central o núcleo desde la que se extienden 2 o más ramificaciones POLY, tales como PEG. La variable y representa el número de ramificaciones POLY, en la que cada uno de las ramificaciones poliméricas independientemente puede estar protegida en el extremo o como alternativa, poseer un grupo reactivo funcional en su extremo. Una estructura más explícita de acuerdo con esta realización de la invención posee la estructura, R(POLY-Z)<sub>y</sub>, en la que cada Z es independientemente un grupo de protección terminal o un grupo reactivo, por ejemplo, adecuado para la reacción con un resto GLP-1. En todavía una realización adicional, cuando Z es un grupo reactivo, tras la reacción con un resto GLP-1, la unión resultante puede ser hidrolíticamente estable, o como alternativa, puede ser degradable, es decir, hidrolizable. Típicamente, al menos una ramificación polimérica posee un grupo terminal funcional adecuado para la reacción con, por ejemplo, un resto GLP-1. Los PEG ramificados, tales como los representados generalmente por la fórmula, R(PEG)<sub>y</sub> anterior poseen de 2 ramificaciones poliméricas a aproximadamente 300 ramificaciones poliméricas (es decir, n varía de 2 a aproximadamente 300). Preferiblemente, dichos PEG ramificados poseen típicamente de 2 a aproximadamente 25 ramificaciones poliméricas, tales como de 2 a aproximadamente 20 ramificaciones poliméricas, de 2 a aproximadamente 15 ramificaciones poliméricas, o de 3 a aproximadamente 15 ramificaciones poliméricas. Los polímeros multi-ramificados incluyen los que tienen 3, 4, 5, 6, 7 u 8 ramificaciones.

Las moléculas núcleo en los PEG ramificados como se ha descrito anteriormente incluyen polioles, que después se funcionalizan adicionalmente. Dichos polioles incluyen polioles alifáticos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 grupos hidroxilo, incluyendo etilenglicol, alcano dioles, alquilo glicoles, alquilideno alquil dioles, alquil cicloalcano dioles, 1,5-decalindiol, 4,8-bis(hidroximetil)triciclodecano, cicloalquilidenodiolos, dihidroxialcanos, trihidroxialcanos, y similares. También pueden emplearse polioles cicloalifáticos, incluyendo azúcares de cadena lineal o de anillo cerrado y alcoholes de azúcares, tales como manitol, sorbitol, inositol, xilitol, quebrachitol, treitol, arabitol, eritritol, adonitol, ducitol, facosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lioxsa, ramnosa, galactosa, glucosa, fructosa, sorbosa, mannosa, piranosa, altrosa, talosa, tagitosa, piranosidos, sacarosa, lactosa, maltosa, y similares. Los polioles alifáticos adicionales incluyen derivados de gliceraldehído, glucosa, ribosa, mannosa, galactosa, y estereoisómeros relacionados. Otros polioles núcleo que pueden usarse incluyen éter corona, ciclodextrinas, dextrinas y otros carbohidratos, tales como almidones y amilosa. Los polioles típicos incluyen glicerol, pentaeritritol, sorbitol y trimetilolpropano.

Como se describirá en más detalle en la sección de enlazadores a continuación, aunque cualquiera de un número de uniones puede usarse para unir covalentemente un polímero a un resto GLP-1, en ciertos casos, la unión es degradable, denominada en este documento como L<sub>D</sub>, es decir, contiene al menos un enlace o resto que se hidroliza en condiciones fisiológicas, por ejemplo, un éster, carbamato hidrolizable, carbonato, u otro de dicho grupo.

Los PEG multi-ramificados ilustrativos que tienen 3 ramificaciones, 4 ramificaciones y 8 ramificaciones corresponden a los de Nektar's Advanced PEGylation Catalog 2005-2006, página 26. Los polímeros multi-ramificados activados para su uso en el procedimiento de la invención incluyen los que corresponden a la siguiente estructura, en la que E representa un grupo reactivo adecuado para la reacción con un grupo reactivo en el resto GLP-1. En una o más realizaciones, E es un grupo -OH (para la reacción con un grupo carboxi del GLP-1 o equivalente), un ácido carboxílico o equivalente (tal como un éster activo), un ácido carbónico (para la reacción con grupos -OH de GLP-1), o un grupo amino.



5 En la estructura anterior, PEG es  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , y  $m$  se selecciona entre 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En ciertas realizaciones, las uniones típicas son éster, carboxilo y carbamato hidrolizable, de tal manera que la porción polimérica del conjugado se hidroliza *in vivo* para liberar el resto GLP-1 del conjugado polimérico intacto. En tales casos, en enlazador L se denomina  $L_D$ .

10 Como alternativa, el polímero puede poseer una estructura bifurcada total como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.362.254. Este tipo de segmento polimérico es útil para la reacción con dos restos GLP-1, en el que los dos restos GLP-1 se sitúan separados una distancia precisa o predeterminada.

15 En cualquiera de las estructuras representativas proporcionadas en este documento, una o más uniones degradables puede estar contenida adicionalmente en el segmento polimérico, POLY, para permitir la generación *in vivo* de un conjugado que tenga una cadena de PEG más pequeña que en el conjugado que se ha administrado inicialmente. Las uniones fisiológicamente escindibles (es decir, liberables) apropiadas incluyen, pero sin limitación, éster, éster carbonato, carbamato, sulfato, fosfato, aciloxialquilo éter, acetal y cetal. Dichas uniones, cuando están contenidas en un segmento polimérico determinado, a menudo serán estables tras el almacenamiento y tras la administración inicial.

20 El polímero de PEG usado para preparar un conjugado polimérico de GLP-1 puede comprender una molécula de PEG colgante que tenga grupos reactivos, tales como carboxilo o amino, únicos covalentemente a lo largo de la longitud del PEG en lugar de en el extremo de la cadena o las cadenas de PEG. Los grupos reactivos colgantes pueden estar unidos al PEG directamente o a través de un resto separador, tal como un grupo alquileo.

25 Los PEG representativos adicionales que tienen estructuras lineales o ramificadas para su uso en la formación de un conjugado de la invención pueden adquirirse en Nektar Therapeutics (anteriormente Shearagua Corporation, Huntsville, Alabama). Los reactivos de PEG ilustrativos se describen en el catálogo de Nektar de 2005-2006, titulado, "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation".

### 30 Unión Liberable

Preferiblemente, un conjugado polimérico de GLP-1 de acuerdo con un aspecto de la invención es uno que comprende un resto GLP-1 unido de forma liberable, preferiblemente en su extremo N, a un polímero soluble en agua.

35 Los reactivos de PEG ilustrativos para su uso en la preparación de un conjugado de GLP-1 liberable de acuerdo con la invención se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6.348.558, 5.612.460, 5.840.900, 5.880.131 y 6.376.470.

40 Los reactivos de PEG adicionales para su uso en la invención incluyen PEG y enlazadores hidrolizables o liberables, tales como los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/454.971, presentada el 16 de junio de 2006. En el conjugado resultante, cada uno del resto GLP-1 y el polímero se une covalentemente a diferentes posiciones de la estructura armazón aromática, por ejemplo, Fmoc o FMS, y son liberables en condiciones fisiológicas. Las estructuras generalizadas que corresponden a los polímeros descritos en la misma se proporcionan más adelante.

A continuación, se describirán los conjugados ejemplares de acuerdo con la invención.

50 Se espera que el resto GLP-1 comparta (al menos en parte) una secuencia aminoacídica similar o relacionada con un GLP-1 humano. Por lo tanto, como se ha indicado previamente, aunque se haga referencia a ubicaciones o átomos específicos en una secuencia de GLP-1, una referencia de este tipo se hará únicamente con fines de comodidad y un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente la ubicación o el átomo correspondientes en otros restos que tengan actividad del GLP-1. En particular, la descripción proporcionada en este documento para un GLP-1 humano a menudo también es aplicable no sólo a un GLP-1 humano, sino a fragmentos, variantes de delección, variantes de sustitución y variantes de adición de cualquiera de los anteriores.

55 Los grupos amino en un resto GLP-1 proporcionan un punto de unión entre el resto GLP-1 y el polímero soluble en

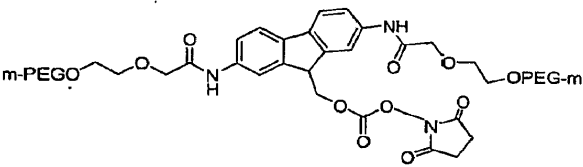
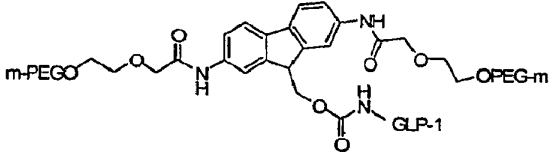
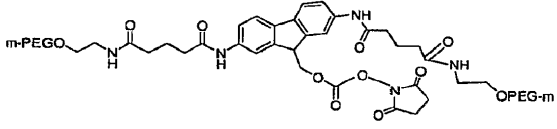
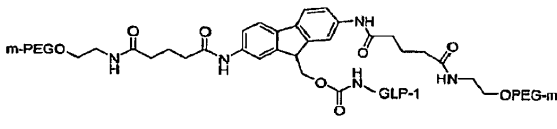
agua. Por ejemplo, cada una de las SEC ID N°: 1 y 2 comprende dos residuos de lisina, conteniendo cada residuo de lisina un grupo ε-amino que puede estar disponible para la conjugación, así como un extremo amino. Véase, las SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2. Por lo tanto, los puntos de unión ejemplares incluyen la unión a un aminoácido (a través de la cadena lateral que contiene la amina de un residuo de lisina) en cualquiera o ambas posiciones 26 y 34. Los puntos de unión típicos de GLP-1 incluyen la unión en una cualquiera de las posiciones 26, 34 y el extremo N. En una o más realizaciones, la unión es una unión individual en una de las posiciones 26, 34 o el extremo N (His 7).

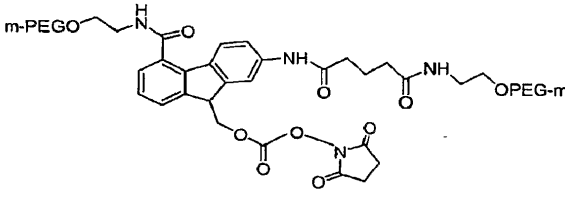
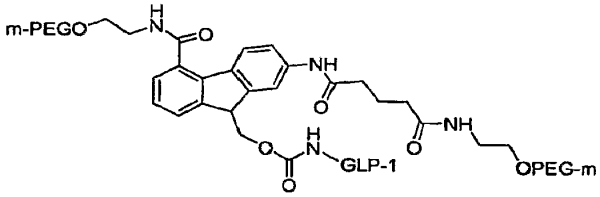
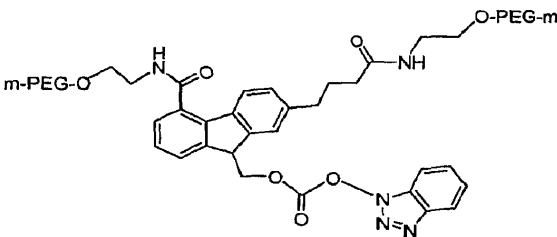
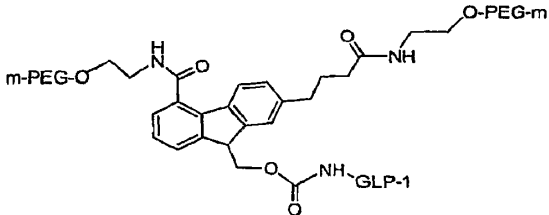
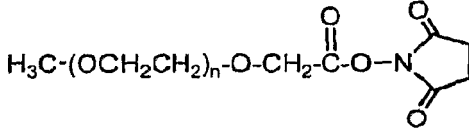
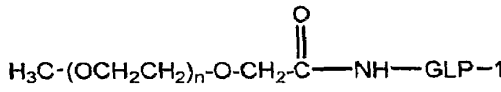
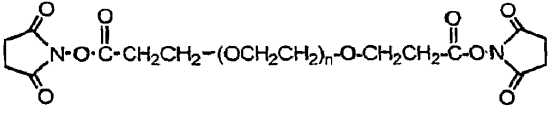
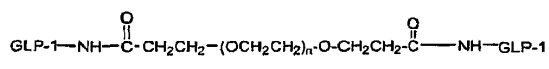
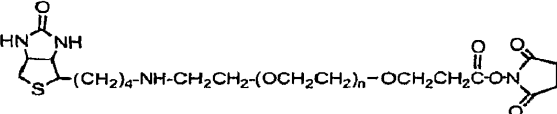
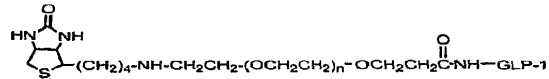
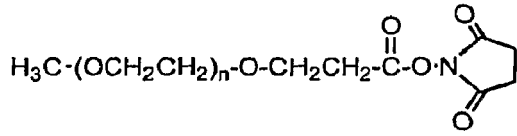
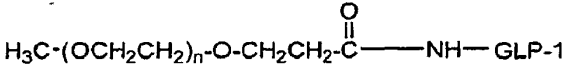
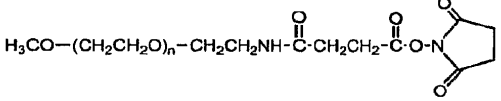
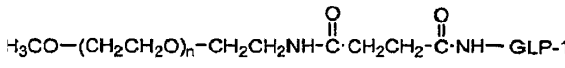
Existen varios ejemplos de reactivos poliméricos solubles en agua útiles para la formación de uniones covalentes con aminas disponibles de un resto GLP-1. Se proporcionan algunos ejemplos específicos, junto con los conjugados correspondientes, en la Tabla 1 que se muestra a continuación. En la tabla, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas de repetición y "(GLP-1)" representa un resto GLP-1 tras la conjugación para dar el polímero soluble en agua. Cada porción polimérica [por ejemplo, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> o (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>] presentada en la Tabla 1 termina en un grupo "CH<sub>3</sub>", por lo tanto pueden sustituirse otros grupos (tal como H y bencilo).

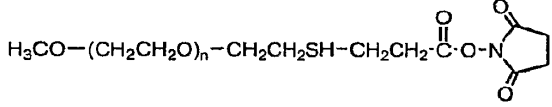
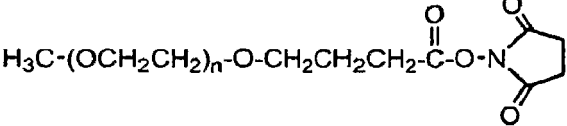
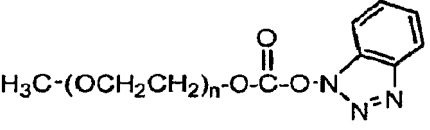
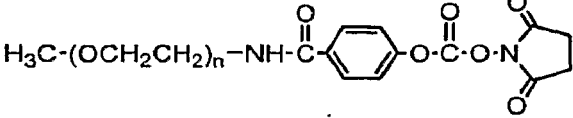
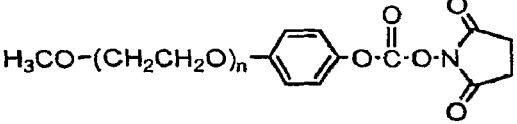
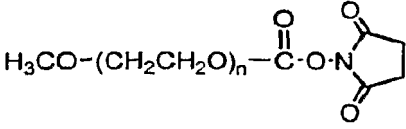
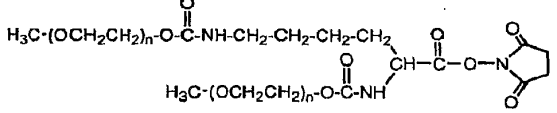
Como se entenderá fácilmente por un experto en la técnica, para conjugados, tales como los expuestos a continuación resultantes de una reacción con un grupo amino de GLP-1, el grupo amino que se extiende de la denominación GLP-1 "-NH-GLP-1" representa el residuo del propio resto GLP-1 en el que el -NH- es un grupo amino del resto GLP-1. Un sitio de unión preferido para los reactivos poliméricos mostrados a continuación es el extremo N. Además, aunque los conjugados de las Tablas que se representan en este documento ilustran un único polímero soluble en agua unido covalentemente a un resto GLP-1, se entenderá que las estructuras de conjugados de la derecha también pretenden incluir conjugados que tienen más de una de dichas moléculas poliméricas solubles en agua unidas covalentemente a GLP-1, por ejemplo, 2, 3 ó 4 moléculas poliméricas solubles en agua.

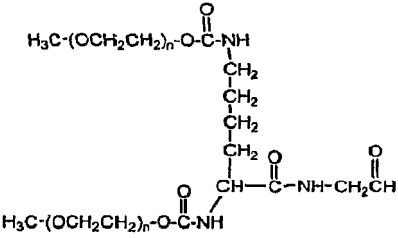
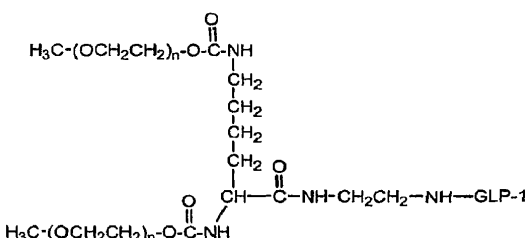
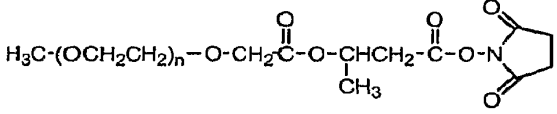
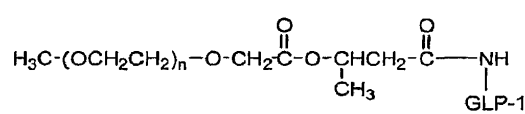
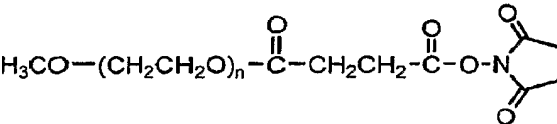
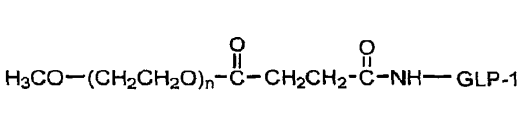
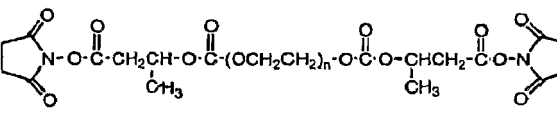
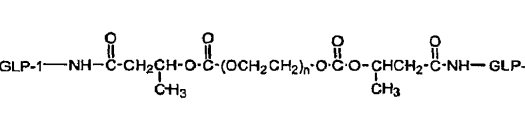
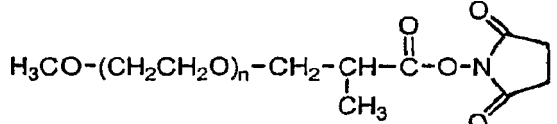
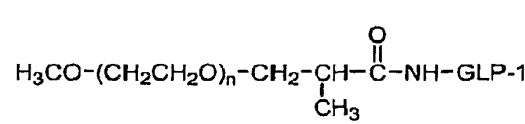
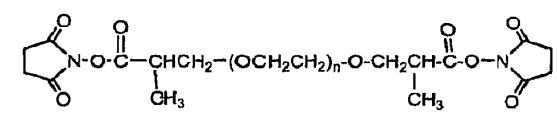
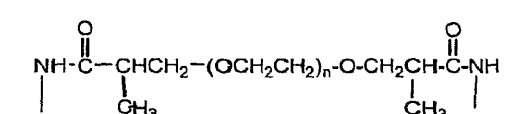
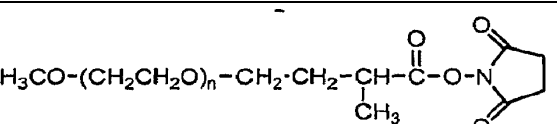
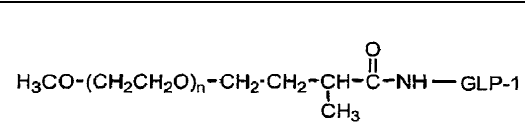
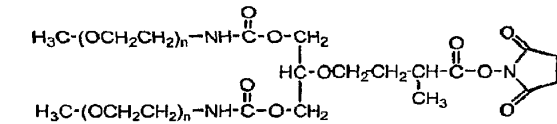
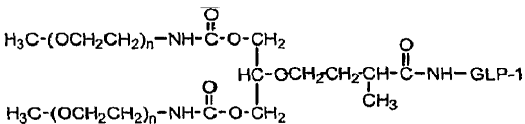
Tabla 1

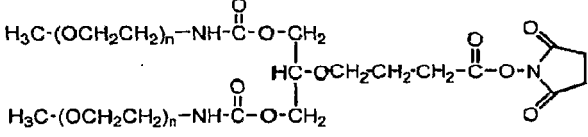
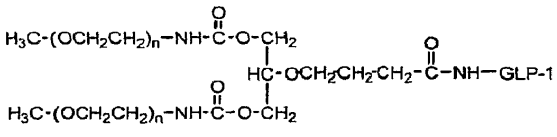
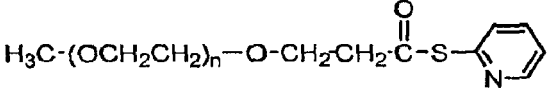
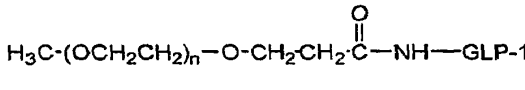
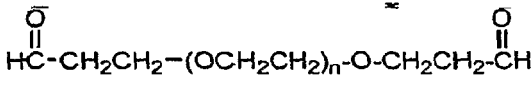
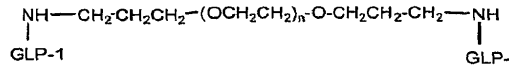
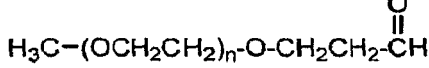
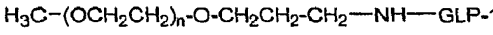
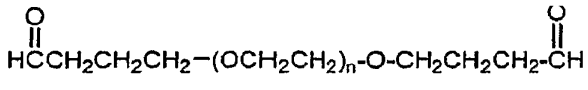
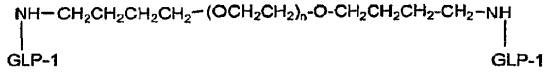
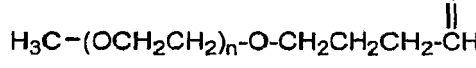
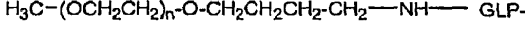
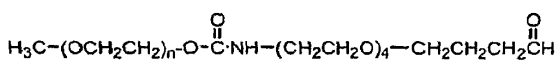
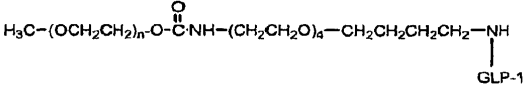
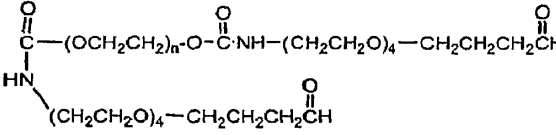
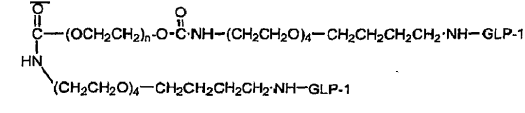
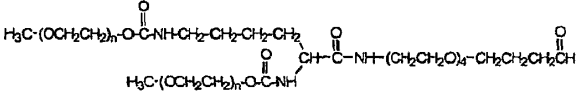
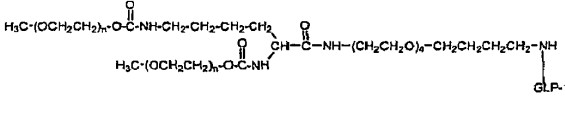
Reactivos poliméricos específicos de amina y el conjugado del resto GLP-1 formado a partir de los mismos

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N} \\ \text{C} \\ \text{N} \end{array}$ <p>Reactivo de mPEG-Oxicarbonilimidazol</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ <p>Reactivo de mPEG Nitrofenilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3$ <p>Reactivo de Carbonato de mPEG-Triclorofenilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Carbamato</p>
 <p>Reactivo de Fmoc-NHS</p>	 <p>Enlace Carbamato</p>
 <p>Reactivo de Fmoc-NHS</p>	 <p>Enlace Carbamato</p>

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
 <p data-bbox="379 555 635 584">Reactivo de Fmoc-NHS</p>	 <p data-bbox="1043 555 1241 584">Enlace Carbamato</p>
 <p data-bbox="379 913 635 943">Reactivo de Fmoc-BTC</p>	 <p data-bbox="1043 913 1241 943">Enlace Carbamato</p>
 <p data-bbox="327 1146 686 1176">Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p data-bbox="1069 1131 1220 1160">Enlace Amida</p>
 <p data-bbox="231 1339 774 1368">Reactivo de mPEG-Succinimidilo Homobifuncional</p>	 <p data-bbox="1061 1317 1228 1346">Enlaces Amida</p>
 <p data-bbox="231 1556 774 1585">Reactivo de mPEG-Succinimidilo Heterobifuncional</p>	 <p data-bbox="1069 1541 1220 1570">Enlace Amida</p>
 <p data-bbox="327 1787 686 1816">Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p data-bbox="1069 1765 1220 1794">Enlace Amida</p>
 <p data-bbox="327 1982 686 2011">Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p data-bbox="1069 1966 1220 1995">Enlace Amida</p>

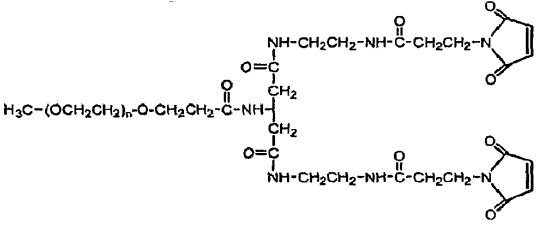
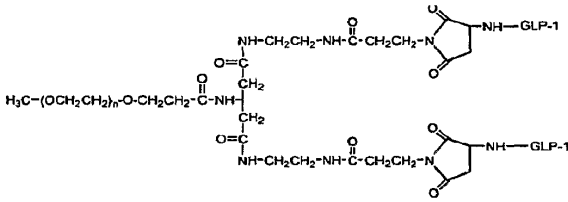
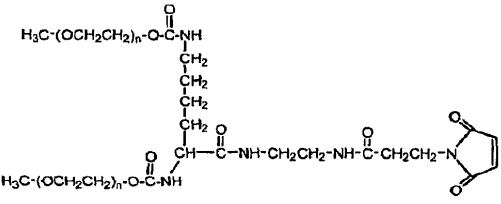
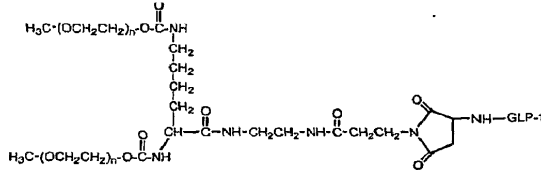
Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de Carbonato de mPEG-Benzotriazol</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Carbamato</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N})-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$  <p>Reactivo de mPEG2-N-Hidroxisuccinimida Ramificado</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{GLP-1})-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$ <p>Enlace Amida</p>

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
 <p>Reactivo de mPEG2-Aldehído Ramificado</p>	 <p>Enlace Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo Homobifuncional</p>	 <p>Enlaces Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de Propionato de PEG-Succinimidilo Homobifuncional</p>	 <p>Enlaces Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Succinimidilo</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG2-N-Hidroxisuccinimida Ramificado</p>	 <p>Enlace Amida</p>

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
 <p>Reactivo de mPEG2-N-Hidroxisuccinimida Ramificado</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de mPEG-Tioéster</p>	 <p>Enlace Amida</p>
 <p>Reactivo de PEG Propionaldehído Homobifuncional</p>	 <p>Enlaces Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de mPEG Propionaldehído</p>	 <p>Enlace Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de PEG Butiraldehído Homobifuncional</p>	 <p>Enlaces Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de mPEG Butiraldehído</p>	 <p>Enlace Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de mPEG Butiraldehído</p>	 <p>Enlace Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de PEG Butiraldehído Homobifuncional</p>	 <p>Enlaces Amida Secundaria</p>
 <p>Reactivo de PEG Butiraldehído Ramificado</p>	 <p>Enlace Amida Secundaria</p>

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ <p>Reactivo de PEG Butiraldehído Ramificado</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{GLP-1} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ <p>Enlace Amida Secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{OCH}_2\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ <p>Reactivo de mPEG Acetal</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida Secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}$ <p>Reactivo de mPEG Piperidona</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida Secundaria (a un carbono secundario)</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p>Reactivo de mPEG Metilcetona</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{NH}-\text{GLP-1}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CH}_3$ <p>Enlace Amida Secundaria (a un carbono secundario)</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ <p>Reactivo de mPEG Tresilato</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amida Secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}$ <p>Reactivo de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción, tales como pH &gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amina Secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}$ <p>Reactivo de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción, tales como pH &gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amina Secundaria</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}$ <p>Reactivo de mPEG Maleimida (en determinadas condiciones de reacción, tales como pH &gt;8)</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{O}-\text{NH}-\text{GLP-1}$ <p>Enlace Amina Secundaria</p>



Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
 <p data-bbox="193 577 820 633">Reactivo de mPEG Maleimida Bifurcado (en determinadas condiciones de reacción, tales como pH &gt;8)</p>	 <p data-bbox="1002 577 1294 607">Enlaces Amina Secundaria</p>
 <p data-bbox="193 884 820 940">Reactivo de mPEG Maleimida Ramificada (en determinadas condiciones de reacción, tales como pH &gt;8)</p>	 <p data-bbox="1007 891 1289 920">Enlace Amina Secundaria</p>

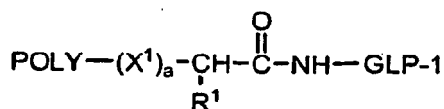
CONJUGACIÓN DE AMINA Y CONJUGADOS RESULTANTES

La conjugación de un reactivo polimérico a un grupo amina de un resto GLP-1 puede realizarse mediante una diversidad de técnicas. En un enfoque, un resto GLP-1 se conjuga a un reactivo polimérico funcionalizado con un éster activo, tal como un derivado de succinimidilo (por ejemplo, un éster N-hidroxisuccinimida). En este enfoque, el reactivo polimérico que lleva el éster reactivo se hace reaccionar con el resto GLP-1 en medio acuoso en las condiciones de pH apropiadas, de pH que varían de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6,5. La mayor parte de los ésteres activos poliméricos pueden acoplarse a una proteína diana, tal como GLP-1 a pH fisiológico, por ejemplo, a 7,0. Sin embargo, los derivados menos reactivos pueden requerir un pH mayor. Típicamente, los PEG activados pueden unirse a una proteína, tal como GLP-1 a pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10,0 para la unión covalente a una lisina interna. Típicamente, se usan pH inferiores, por ejemplo, de 4 a aproximadamente 5,75, para la unión covalente preferida al extremo N. Por lo tanto, las condiciones de reacción diferentes (por ejemplo, diferentes pH o diferentes temperaturas) pueden dar como resultado la unión de un polímero soluble en agua, tal como PEG para diferentes ubicaciones en el resto GLP-1 (por ejemplo, lisinas internas frente al extremo N). Las reacciones de acoplamiento a menudo pueden realizarse a temperatura ambiente, aunque pueden requerirse temperaturas inferiores para restos GLP-1 particularmente inestables. Los tiempos de reacción están típicamente en el orden de minutos, por ejemplo, 30 minutos, a horas, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 36 horas), dependiendo del pH y la temperatura de la reacción. La PEGilación N-terminal, por ejemplo, con un reactivo PEG que tiene un grupo aldehído, se realiza típicamente en condiciones moderadas, pH de aproximadamente 5-10, durante aproximadamente 6 a 36 horas. Pueden emplearse proporciones variables del reactivo polimérico con respecto a un resto GLP-1, por ejemplo, de una proporción equimolar hasta un exceso molar de 10 veces del reactivo polimérico. Típicamente, será suficiente hasta un exceso molar de 5 veces del reactivo polimérico.

En ciertos casos, puede ser preferible proteger ciertos aminoácidos de la reacción con un reactivo polimérico particular si se desea la unión covalente específica de sitio usando metodologías de protección/desprotección empleadas comúnmente, tales como las que se conocen bien en la técnica. Los conjugados de mono-GLP-1 conjugados selectivamente en el extremo N de GLP-1 se prepararon como se describen en detalle en los Ejemplos en este documento sin la necesidad de emplear estrategias de protección/desprotección.

En un procedimiento alternativo para dirigir reacciones de acoplamiento, el reactivo de PEG puede incorporarse en una posición deseada del resto GLP-1 durante la síntesis peptídica. De este modo, puede conseguirse la introducción selectiva de sitio de uno o más PEG. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 95/00162, que describe la síntesis selectiva de sitio de los péptidos conjugados.

Los conjugados ejemplares que pueden prepararse usando, por ejemplo, reactivos poliméricos que contienen un éster reactivo para el acoplamiento a un grupo amino de GLP-1, comprenden la siguiente estructura alfa-ramificada:

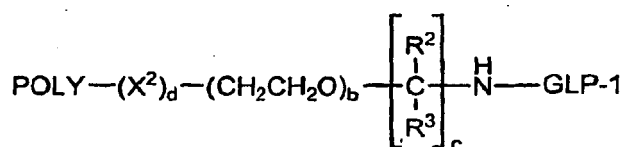


5 en la que POLY es un polímero soluble en agua, (a) es cero o uno;  $X^1$ , cuando está presente, es un resto separador que comprende uno o más átomos;  $R^1$  es hidrógeno o un radical orgánico; y "NH-GLP-1" representa un residuo de un resto GLP-1, en el que el grupo subrayado representa un grupo amino del resto GLP-1.

10 Con respecto a la estructura que corresponde a la que se ha hecho referencia en el párrafo inmediatamente anterior, cualquiera de los polímeros solubles en agua proporcionados en este documento puede definirse como POLY, cualquiera de los restos separadores proporcionados en este documento puede definirse como  $X^1$  (cuando está presente), cualquiera de los radicales orgánicos proporcionados en este documento puede definirse como  $R^1$  (en casos en los que  $R^1$  no sea hidrógeno), y cualquiera de los restos GLP-1 proporcionados en este documento puede definirse como GLP-1. En una o más realizaciones que corresponden a la estructura a la que se ha hecho referencia en el párrafo inmediatamente anterior, POLY es un poli(etilenglicol), tal como  $\text{H}_3\text{CO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ , en la que (n) es un número entero que tiene un valor de 3 a 4000, más preferiblemente de 10 a aproximadamente 1800; (a) es uno;  $X^1$  es un alquileo  $\text{C}_{1-6}$ , tal como uno seleccionado entre metileno (es decir,  $-\text{CH}_2-$ ), etileno (es decir,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) y propileno (es decir,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ );  $R^1$  es H o alquilo inferior, tal como metilo o etilo; y GLP-1 corresponde a la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 2.

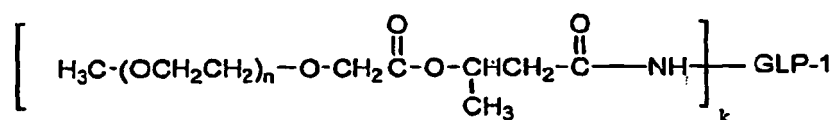
20 Típico de otro procedimiento para la conjugación de un resto GLP-1 a un reactivo polimérico es la aminación reductora. Típicamente, la aminación reductora se emplea para conjugar una amina primaria de un resto GLP-1 con un reactivo polimérico funcionalizado con una cetona, aldehído o una forma hidratada de los mismos (por ejemplo, cetona hidratado y aldehído hidratado). En este procedimiento, la amina primaria del resto GLP-1 (por ejemplo, el extremo N) reacciona con el grupo carbonilo del aldehído o la cetona (o el grupo que contiene hidroxilo correspondiente de un aldehído o cetona hidratados), formando de esta manera una base Schiff. Después, la base Schiff, a su vez, se convierte de forma reductora en un conjugado estable a través de use de un agente reductor, tal como borohidruro sódico o cualquier otro agente reductor adecuado. Las reacciones selectivas (por ejemplo, en el extremo N son posibles) son posibles, particularmente con un polímero funcionalizado con una cetona o un alfa-metil aldehído ramificado y/o en condiciones específicas de reacción (por ejemplo, pH reducido).

30 Los conjugados ejemplares que pueden prepararse usando, por ejemplo, reactivos poliméricos que contienen un aldehído (o aldehído hidratado) o una cetona o (cetona hidratado) poseen la siguiente estructura:



35 en la que POLY es un polímero soluble en agua; (d) es cero o uno;  $X^2$ , cuando está presente, es un resto separador que comprende uno o más átomos; (b) es un número entero que tiene un valor de uno a diez; (c) es un número entero que tiene un valor de uno a diez;  $R^2$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico;  $R^3$ , en cada caso, es independientemente H o un radical orgánico; y "NH-GLP-1" representa un residuo de un resto GLP-1, en el que el grupo amino subrayado representa un grupo amino del resto GLP-1.

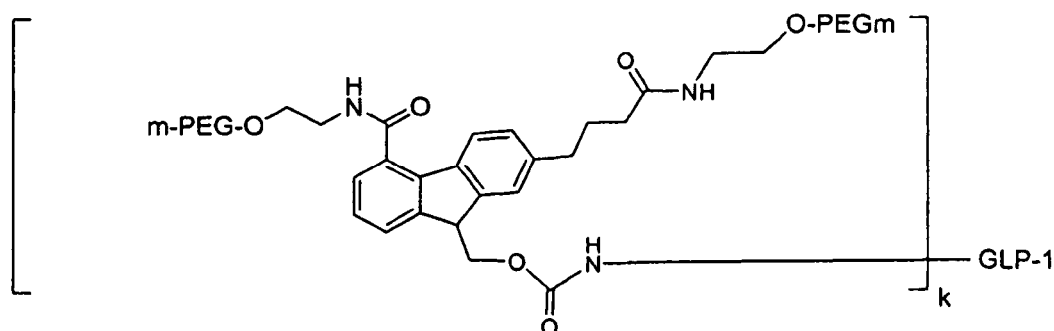
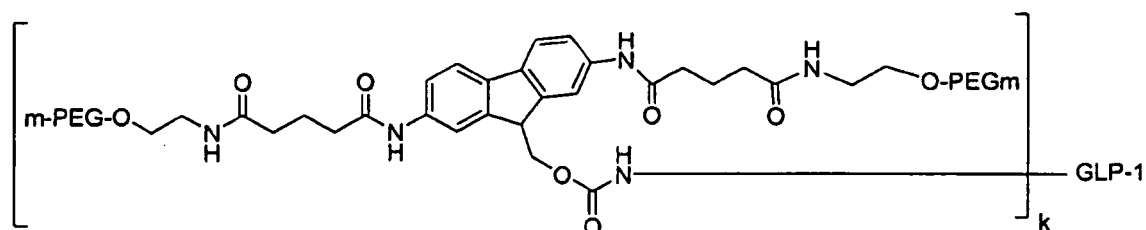
40 Todavía otro conjugado ilustrativo posee la estructura:



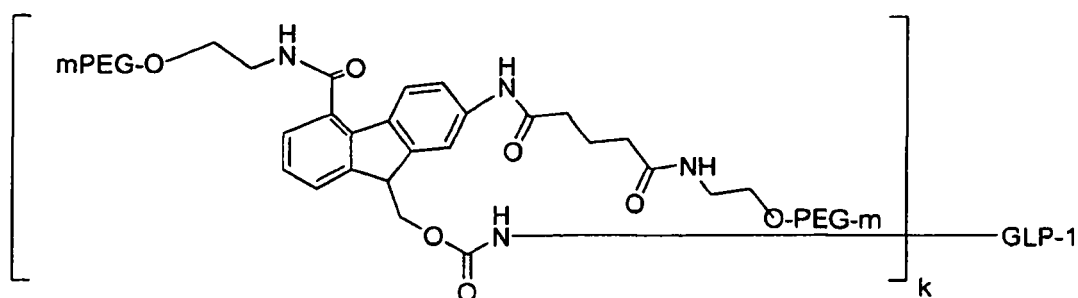
45 en la que k varía de 1 a 3, y n varía de 10 a aproximadamente 1800.

50 Con respecto a la estructura que corresponde a la que se ha hecho referencia en el párrafo inmediatamente anterior, cualquiera de los polímeros solubles en agua proporcionados en este documento puede definirse como POLY, cualquiera de los restos separadores proporcionados en este documento puede definirse como  $X^2$  (cuando está presente), cualquiera de los radicales orgánicos proporcionados en este documento puede definirse independientemente como  $R^2$  y  $R^3$  (en casos en los que  $R^2$  y  $R^3$  no sea independientemente hidrógeno), y cualquiera





5 y



10 Generalmente, se emplea un ligero exceso molar de maleimida polimérica, por ejemplo, un exceso molar de 1,5 a 15 veces, preferiblemente un exceso molar de 2 a 10 veces. Los tiempos de reacción generalmente varían de aproximadamente 15 minutos a varias horas, por ejemplo, 8 o más horas, a temperatura ambiente. Para los grupos sulfhidrido con impedimentos estéricos los tiempos de reacción requeridos pueden ser significativamente mayores. Las temperaturas para las reacciones de conjugación están típicamente, aunque no necesariamente, en el intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C; con frecuencia la conjugación se realiza a temperatura ambiente o menos. A menudo las reacciones de conjugación se realizan en un tampón, tal como tampón fosfato o acetato o un sistema similar.

20 Con respecto a la concentración de reactivo, un exceso del reactivo polimérico se combina típicamente con el resto GLP-1. La reacción de conjugación se deja continuar hasta que no aparece sustancialmente ninguna conjugación más, lo que puede determinarse generalmente controlando la evolución de la reacción en el tiempo.

25 La evolución de la reacción puede controlarse con alícuotas aceptadas de la mezcla de reacción en diversos momentos de tiempo y analizando la mezcla de reacción por SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF o cualquier otro procedimiento analítico adecuado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formada o la cantidad de polímero no conjugado restante, se asume que la reacción se ha completado. Típicamente, la reacción de conjugación tarda de minutos a varias horas (por ejemplo, de 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante está preferiblemente, pero no necesariamente, purificada, para retirar por separación el exceso de reactivos, especies multi-conjugadas no deseadas de reactivos no conjugados (por ejemplo, GLP-1), y un polímero libre o sin reaccionar. Después, los conjugados resultantes pueden caracterizarse adicionalmente usando procedimientos analíticos, tales como MALDI, electroforesis capilar, electroforesis en gel y/o cromatografía.

30 Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos el conjugado de polímero soluble en agua-(GLP-1) incluirá un

polímero soluble en agua no lineal. Un polímero soluble en agua no lineal de este tipo incluye un polímero soluble en agua ramificado (aunque también se contemplan otros polímeros solubles en agua no lineales). Por lo tanto, en una o más realizaciones de la invención, el conjugado comprende un resto GLP-1 que comprende una amina interna o N-terminal unida covalentemente, directamente o a través de un resto separador que comprende uno o más átomos, a un polímero soluble en agua ramificado. Como se usa en este documento, una amina interna es una amina que no es parte del aminoácido N-terminal (lo que significa no sólo la amina N-terminal, sino cualquier amina en la cadena lateral del aminoácido N-terminal).

Aunque dichos conjugados incluyen un polímero soluble en agua ramificado unido (directamente o a través de un resto separador) a un resto GLP-1 en un aminoácido interno del resto GLP-1, también pueden unirse polímeros solubles en agua ramificados adicionales al mismo resto GLP-1 en otras ubicaciones. Por lo tanto, por ejemplo, un conjugado que incluye un polímero soluble en agua ramificado unido (directamente o a través de un resto separador) a un resto GLP-1 en un aminoácido interno del resto GLP-1, puede incluir adicionalmente un polímero soluble en agua ramificado adicional unido covalentemente, directamente o a través de un resto separador que comprende uno o más átomos, al residuo aminoacídico N-terminal, tal como en la amina N-terminal.

Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos, el polímero soluble en agua ramificado puede carecer de un residuo de lisina en el que las porciones poliméricas se conectan a los grupos amina de la lisina a través de un grupo "-OCH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CO-". En aún otros casos, el polímero soluble en agua ramificado carece de un residuo de lisina (en el que el residuo de lisina se usa para realizar la ramificación).

R es una molécula núcleo como se ha descrito previamente, P es un separador, Z es -O-, -NH- o -CH<sub>2</sub>-, -O-GLP-1 es un residuo hidroxilo de un resto GLP-1, e y es de 3 a 15. Preferiblemente, -NH-P-Z-C(O)- es un residuo de un aminoácido de origen natural o sintético.

Los conjugados ejemplares adicionales, algunos de los cuales están de acuerdo con la invención, se proporcionan en los Ejemplos 4-26 en este documento.

#### PURIFICACIÓN

Los conjugados poliméricos de GLP-1 descritos en este documento pueden purificarse para obtener/aislar diferentes especies de conjugados. Específicamente, una mezcla de producto puede purificarse para obtener una media de cualquiera de uno, dos o tres o incluso más PEG por resto GLP-1. En una realización de la invención, los conjugados de GLP-1 preferidos son mono-conjugados. La estrategia de purificación de la mezcla de reacción del conjugado final dependerá de varios factores, incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del reactivo polimérico empleado, el resto GLP-1, y las características del producto, por ejemplo, monómero, dímero, isómeros posicionales particulares, etc.

Si se desea, pueden aislarse conjugados que tienen diferentes pesos moleculares usando cromatografía de filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de filtración en gel puede usarse para fraccionar diferentes conjugados de GLP-1 (por ejemplo, 1-mero, 2-mero, 3-mero, y así sucesivamente, en los que "1-mero" indica una molécula polimérica por GLP-1, "2-mero" indica dos polímeros unidos a GLP-1, y así sucesivamente) en base a sus diferentes pesos moleculares (en los que la diferencia corresponde básicamente al peso molecular medio del polímero soluble en agua. Aunque este procedimiento puede usarse para separar PEG y otros conjugados poliméricos de GLP-1 que tienen diferentes pesos moleculares, generalmente este procedimiento es ineficaz para separar isómeros posicionales que tengan diferentes sitios de unión al polímero en el resto GLP-1. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de filtración en gel para separar cada una de las mezclas diferentes de PEG 1-meros, 2-meros, 3-meros, y así sucesivamente, aunque cada una de las composiciones PEG-mero recuperadas puede contener PEG unidos a diferentes grupos reactivos amino (por ejemplo, residuos de lisina) u otros grupos funcionales del resto GLP-1.

Las columnas de filtración en gel adecuadas para realizar este tipo de separación incluyen las columnas Superdex™ y Sephadex™ disponibles en Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La sección de una columna particular dependerá del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución se realiza generalmente usando un tampón adecuado, tal como fosfato, acetato, o similar. Las fracciones recogidas pueden analizarse mediante varios procedimientos diferentes, por ejemplo, (i) densidad óptica (DO) a 280 nm para el contenido de proteína, (ii) análisis de la proteína albúmina de suero bovino (BSA), (iii) prueba del yodo para el contenido de PEG (Sims y col. (1980) *Anal. Biochem.*, 107: 60-63), y (iv) electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico y poli(acrilamida) (SDS PAGE), seguido de tinción con yoduro de bario.

La separación de los isómeros posicionales se realiza típicamente por cromatografía de fase inversa usando una columna C18 de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (Amersham Biosciences o Vydac) o por cromatografía de intercambio iónico usando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de intercambio iónico Sepharose™ disponible en Amersham Biosciences. Puede usarse cualquier procedimiento para separar los isómeros de polímero-GLP-1 que tengan el mismo peso molecular (isómeros posicionales).

Preferiblemente, las composiciones purificadas resultantes están sustancialmente libres del resto GLP-1 no conjugado. Además, preferiblemente las composiciones están sustancialmente libres de todos los demás polímeros solubles en agua unidos covalentemente.

5

### Composiciones

#### COMPOSICIONES DE ISÓMEROS CONJUGADOS

- 10 También se proporcionan en este documento composiciones que comprenden uno cualquiera o más de los conjugados poliméricos de GLP-1 descritos en este documento. En ciertos casos, la composición comprenderá una pluralidad de conjugados poliméricos de GLP-1. Por ejemplo, una composición de este tipo puede comprender una mezcla de conjugados poliméricos de GLP-1 que tenga uno, dos o tres moléculas poliméricas solubles en agua unidas covalentemente al sitio en el resto GLP-1. Es decir, una composición de la invención puede comprender una
- 15 mezcla de monómero, dímero, y posiblemente incluso trímero. Como alternativa, la composición puede poseer sólo mono-conjugados, o sólo diconjugados, etc. Una composición de mono-conjugado de GLP-1 comprenderá típicamente restos GLP-1 que tengan sólo un polímero unido covalentemente al mismo, por ejemplo, preferiblemente unido de forma liberable. Una composición mono-conjugada puede comprender sólo un único isómero posicional, o puede comprender una mezcla de diferentes isómeros posicionales que tengan un polímero unido de forma
- 20 covalente a sitios diferentes en el resto GLP-1. Por ejemplo, una composición de mono-conjugado de GLP-1 puede contener una mezcla de especies mono-conjugadas de GLP-1 que tenga un polímero soluble en agua unido a la lisina 26 o la lisina 34. Como alternativa, una composición mono-conjugada puede poseer el polímero soluble en agua unido a sólo la lisina 26, o solo a la lisina 34, o sólo al extremo N.
- 25 En otra realización más, un conjugado de GLP-1 puede poseer múltiples restos GLP-1 unidos covalentemente a un único polímero multi-ramificado que tiene 3 o más ramificaciones poliméricas. Típicamente, cada uno de los restos GLP-1 está unido al mismo sitio aminoacídico del GLP-1, por ejemplo, el extremo N.

- 30 Con respecto a los conjugados en la composición, la composición satisfará típicamente una o más de las siguientes características: al menos aproximadamente el 85% de los conjugados de la composición tendrá de uno a cuatro polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 85% de los conjugados de la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 85% de los conjugados de la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto GLP-1; o al menos aproximadamente el 85% de los conjugados de la composición tendrá un polímero unido al resto GLP-1 (es decir, estará monoPEGilado); al menos aproximadamente
- 35 el 95% de los conjugados de la composición tendrá de uno a cuatro polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 95% de los conjugados de la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 95% de los conjugados de la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 95% de los conjugados de la composición tendrá un polímero unido al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 99% de los conjugados de la composición tendrá de uno a cuatro polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 99% de los conjugados de la composición tendrá de uno a tres polímeros unidos al resto GLP-1; al menos aproximadamente el 99% de los conjugados de la composición tendrá de uno a dos polímeros unidos al resto GLP-1; y al menos aproximadamente el 99% de los conjugados de la composición tendrá un polímero unido al resto GLP-1 (es decir, estará monoPEGilado).

- 45 En una o más realizaciones, la composición que contenía los conjugados está libre o sustancialmente libre de albúmina.

- 50 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado que comprende un resto GLP-1 unido covalentemente, por ejemplo, de forma liberable, a un polímero soluble en agua, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular medio en peso de más de aproximadamente 2.000 Daltons; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 55 El control del número deseado de polímeros para la unión covalente a GLP-1 se consigue seleccionando el reactivo polimérico apropiado, la relación de reactivo polimérico con respecto al resto GLP-1, la temperatura, las condiciones de pH, y otros aspectos de la reacción de conjugación. Además, la reducción o eliminación de los conjugados no deseados (por ejemplo, los conjugados que tienen cuatro o más polímeros unidos) puede conseguirse a través de medios de purificación que se han descrito previamente.

- 60 Por ejemplo, los conjugados del resto polímero soluble en agua-(GLP-1) pueden purificarse para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. Específicamente, la mezcla de producto puede purificarse para obtener una media de cualquiera de uno, dos, tres o cuatro PEG por resto GLP-1, típicamente uno, dos o tres PEG por resto GLP-1. En una o más realizaciones, la mezcla de producto contiene un PEG por GLP-1, en la que PEG está unido de forma liberable (a través de hidrólisis) a un polímero de PEG, por ejemplo, un polímero de PEG de cadena ramificada o lineal.

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Opcionalmente, una composición de conjugado de GLP-1 de la invención comprenderá, además del conjugado del GLP-1, un excipiente farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la composición puede comprender

5 adicionalmente excipientes, disolventes, estabilizadores, mejoradores de la penetración en membranas, etc., dependiendo del modo de administración particular y la forma de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen todos los tipos de formulaciones y en particular las que son aptas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse, así como líquidos, así como

10 para inhalación. Los ejemplos de diluyentes adecuados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada en fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas se prevén soluciones y suspensiones. A continuación se describirán en más detalle composiciones adecuadas para la administración pulmonar.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen, sin limitación, carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos.

Los carbohidratos representativos para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen azúcares, azúcares derivatizados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y polímeros de azúcar. Los

20 excipientes de carbohidratos ejemplares adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-mannosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares. Se prefieren, en particular para formulaciones diseñadas para su inhalación, azúcares no reductores, azúcares que pueden formar una fase sustancialmente seca amorfa o vítrea cuando se combinan con la composición de la presente invención, y azúcares que poseen temperaturas de transición vítrea relativamente altas, o Tg (por ejemplo, Tg mayores de 40 °C, o más de 50 °C, o más de 60 °C, o más de 70 °C, o que tienen Tg de 80 °C y superior). Dichos excipientes pueden considerarse excipientes formadores de vidrio.

Los excipientes adicionales incluyen aminoácidos, péptidos y particularmente oligómeros que comprenden 2-9 aminoácidos, o 2-5 meros, y polipéptidos, cada uno de los cuales puede ser una especie homo o hetero. Los aminoácidos representativos incluyen glicina (gly), alanina (ala), valina (val), leucina (leu), isoleucina (ile), metionina

35 (met), prolina (pro), fenilalanina (phe), triptofano (trp), serina (ser), treonina (thr), cisteína (cys), tirosina (tyr), asparagina (asp), ácido glutámico (glu), lisina (lys), arginina (arg), histidina (his), norleucina (nor), y formas modificadas de los mismos.

También son útiles como excipientes, por ejemplo, en composiciones inhalables, di- y tripéptidos que contienen dos o más residuos de leucilo, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional de Nektar Therapeutics WO 01/32144.

Además, se prefieren di- y tripéptidos que tienen una temperatura de transición vítrea de más de aproximadamente 40 °C, o más de 50 °C, o más de 60 °C, o más de 70 °C.

Aunque menos preferidos debido a su limitada solubilidad en agua, los péptidos mejoradores del rendimiento de estabilidad adicional y en aerosol para su uso en composiciones para administración pulmonar incluyen 4-meros y 5-meros que contienen cualquier combinación de aminoácidos como se ha descrito anteriormente. El 4-mero o 5-mero pueden comprender dos o más residuos de leucina. Los residuos de leucina pueden ocupar cualquier posición en el péptido, mientras que las posiciones de los aminoácidos restantes (es decir, no leucilo) se ocupan por cualquier aminoácido que se ha descrito anteriormente, con la condición de que el 4-mero o el 5-mero resultante tenga una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 1 mg/ml. En algunas realizaciones, los aminoácidos no leucilo en un 4-mero o un 5-mero son aminoácidos hidrófilos, tales como lisina, para aumentar de este modo la solubilidad del péptido en agua.

Los excipientes de proteínas ejemplares incluyen albúminas, tales como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, hemoglobina y similares. Las composiciones también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste de pH, típicamente, pero no necesariamente, una sal preparada a partir de un ácido orgánico o base. Los tampones representativos incluyen sales de ácido orgánico de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico. Otros tampones adecuados incluyen Tris, clorhidrato de trometamina, borato, glicerol fosfato y fosfato. También son adecuados aminoácidos, tales como glicina.

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir uno o más excipientes/aditivos poliméricos adicionales, por ejemplo, polivinilpirrolidonas, celulosas derivatizadas, tales como hidroximetilcelulosa,

65

hidroxietilcelulosa y hidroxipropilmetilcelulosa, Ficolls (un azúcar polimérico), almidón de hidroxietilo (HES), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como  $\alpha$ -2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina), polietilenglicoles, y pectina.

- 5 Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes saporíferos, agentes enmascaradores del sabor, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro sódico), agentes antimicrobianos (por ejemplo, cloruro de benzalconio), edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos, tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80", y pluronics, tales como F68 y F88, disponibles en BASF), ésteres de sorbitán, lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, aunque preferiblemente no en forma de liposomas), ácidos grasos y ésteres grasos, esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, cinc u otros cationes adecuados). También puede emplearse el uso de ciertas fosfatidilcolinas di-sustituidas para producir microestructuras perforadas (es decir, microesferas huecas y porosas).

- 10 Se enumeran otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos adecuados para su uso en las composiciones de acuerdo con la presente invención en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21ª ed., Williams & Williams, (2005), y en "Physician's Desk Reference", 60ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2006).

- 15 La cantidad del conjugado de GLP-1 (es decir, el conjugado formado entre el agente activo y el reactivo polimérico) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero será óptimamente una cantidad terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacena en un recipiente de dosis unitaria (por ejemplo, un vial). Además, una preparación farmacéutica, si está en forma de solución, puede alojarse en una jeringa. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente por la administración repetida de cantidades crecientes del conjugado con el fin de determinar que cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

- 20 La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentos de rutina, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que varía de baja a alta), examinando la estabilidad y otros parámetros, y después determinando el intervalo en el que se consigue un rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos.

- 25 Sin embargo, generalmente, el excipiente o los excipientes estarán presentes en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 98% en peso, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95% en peso del excipiente, o con concentraciones de menos del 30% en peso. En general, se desea una alta concentración del resto GLP-1 en la formulación farmacéutica final.

#### COMBINACIÓN DE ACTIVOS

- 30 Una composición de la invención también puede comprender mezcla de conjugados de resto de polímero soluble en agua-(GLP-1) y GLP-1 no conjugado, para proporcionar de esta manera una mezcla de GLP-1 de actuación rápida y actuación prolongada. Como alternativa, la composición también puede comprender, además de un conjugado polimérico soluble en agua de GLP-1, insulina, por ejemplo, una insulina basal, tal como una insulina basal acilada o una insulina basal pl-desplazada. Generalmente, una insulina basal es una que muestra un tiempo de acción prolongado de más de aproximadamente 8 horas en un modelo convencional de diabetes. Las insulinas basales ejemplares incluyen NPH, NPL, PZI, Ultralente e insulina glargina.

- 35 Las composiciones farmacéuticas adicionales de acuerdo con la invención incluyen las que comprenden, además de un conjugado polimérico soluble en agua de GLP-1 de acción prolongada que se describe en este documento, un conjugado polimérico de GLP-1 de acción rápida en el que el polímero soluble en agua está unido de forma liberable a la cadena lateral de la histidina terminal (His7) en el nitrógeno imidazol.

#### COMPOSICIONES PARA ADMINISTRACIÓN PULMONAR

- 40 Las composiciones que comprenden un conjugado polimérico de GLP-1 incluyen las adecuadas para su administran por vía pulmonar. A continuación, se describirán la preparación y características de dichas composiciones inhalable.

- 45 Una realización de la presente invención proporciona composiciones de polvo seco aptas para su administración pulmonar. Las composiciones de polvo seco de la presente invención pueden prepararse mediante cualquiera de varias técnicas de secado, incluyendo secado por pulverización. El secado por pulverización de las composiciones se realiza, por ejemplo, como se describe generalmente en "Spray Drying Handbook", 5ª ed., K. Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1991), y en Platz, R., y col., Publicaciones de Patente Internacional N° WO 97/41833 (1997) y WO 96/32149 (1996).

- 50 Una suspensión o solución que comprende un conjugado de GLP-1 de la presente invención puede secarse por pulverización en una secadora por pulverización convencional, tal como las disponibles en los proveedores comerciales, tales como Niro A/S (Dinamarca), Buchi (Suiza) y similares, dando como resultado un polvo dispersable



y seco. Las condiciones deseables para el secado por pulverización variarán dependiendo de los componentes de la composición, y se determinan generalmente por experimentación. El gas usado para secar por pulverización el material es típicamente aire, aunque también son adecuados gases inertes, tales como nitrógeno o argón. Además, la temperatura de tanto la entrada como la salida del gas usado para secar el material pulverizado es tal que no provoca la degradación de la proteína farmacéutica en el material pulverizado. Dichas temperaturas se determinan típicamente de forma experimental, aunque en general la temperatura de entrada variará de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 200 °C, mientras que la temperatura de salida variará de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 150 °C. Los parámetros pueden incluir presiones de atomización que varían de aproximadamente 137,90-1034,21 kPa (20-150 psi), o de aproximadamente 206,84-689,48 kPa (30-100 psi). Típicamente la presión de atomización empleada será una de las siguientes (kPa (psi)): 137,90 (20), 206,84 (30), 275,79 (40), 344,74 (50), 413,69 (60), 482,63 (70), 551,58 (80), 620,53 (90), 689,48 (100), 758,42 (110), o 827,37 (120) o superior.

Las composiciones respirables de la presente invención que tienen las características descritas en este documento también pueden producirse secando ciertos componentes de la composición, que dan como resultado la formación de un polvo de microestructura perforada como se describe en el documento WO 99/16419. Los polvos de microestructura perforada típicamente comprenden microesferas secadas por pulverización huecas que tienen una pared porosa relativamente delgada que define un gran vacío interno. Los polvos de microestructura perforada pueden dispersarse en un medio de suspensión seleccionado (tal como un agente de soplado no acuoso y/o fluorado) para proporcionar dispersiones estabilizadas antes del secado. El uso de microestructuras o micropartículas perforadas (o porosas) de densidad relativamente baja reduce significativamente las fuerzas de atracción entre las partículas, reduciendo de este modo las fuerzas de cizalladura, aumentando la fluidez y la dispersabilidad de los polvos resultantes, y reduciendo la degradación por floculación, sedimentación o batido de las dispersiones estabilizadas de las mismas.

Como alternativa, pueden prepararse polvos por liofilización, secado al vacío, secado por congelación de pulverización en refrigeración, procesamiento de fluidos supercríticos (por ejemplo, como se describe en Hanna, y col., Pat. de Estados Unidos N° 6.063.138), secado al aire, u otras formas de secado de evaporación.

Los polvos secos también pueden prepararse mezclando, moliendo, tamizando o por molienda a chorro de los componentes de la composición en forma de polvo seco.

Una vez que se formó, las composiciones de polvo seco se mantienen preferiblemente en condiciones secas (es decir, humedad relativamente baja) durante su fabricación, procesamiento y almacenamiento. Independientemente del proceso de secado empleado, el proceso preferiblemente dará como resultado partículas inhalables, altamente dispersables que comprenden los conjugados de GLP-1 de la presente invención.

En una o más realizaciones, los polvos de la presente invención pueden caracterizarse por varias características, más en particular, (i) dispersabilidades constantemente altas, que se mantienen, incluso tras el almacenamiento, (ii) tamaños de partículas aerodinámicas pequeños (DMMA), (iii) valores de la dosis de partículas finas mejorados, es decir, polvos que tienen tamaños de partículas de menos de 10 micrómetros, cada uno de los cuales contribuye a la capacidad mejorada del polvo para penetrar en los tejidos del tracto respiratorio inferior (es decir, los alveolos) para su administración a la circulación sistémica. Estas características físicas de los polvos inhalables de la presente invención, que se describen más completamente más adelante, tienen una función en la maximización de la eficacia de la administración en aerosol de dichos polvos al pulmón profundo.

Las partículas de la presente invención pueden tener generalmente un diámetro medio de masa (DMM), o un diámetro geométrico medio de volumen (DGMV), o un diámetro equivalente medio de masa (DEMM), o un diámetro geométrico medio de masa (DGMM), de menos de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o menos de aproximadamente 7,5  $\mu\text{m}$ , o menos de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , o menos de aproximadamente 3,3  $\mu\text{m}$ , y normalmente están en el intervalo de 0,1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los polvos preferidos se componen de partículas que tienen un DMM, DGMV, DEMM o DGMM de aproximadamente 1 a 5  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, el polvo también contienen partículas vehículo no respirables, tales como lactosa, en el las partículas no respirables típicamente tienen un tamaño de más de aproximadamente 40 micrómetros.

Los polvos de la presente invención también pueden caracterizarse por una distribución del tamaño de partícula en aerosol - diámetro medio de masa aerodinámico (DMMA) - que tiene típicamente DMMA de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , tales como menos de 5  $\mu\text{m}$ , menos de 4,0  $\mu\text{m}$ , menos de 3,3  $\mu\text{m}$  o menos de 3  $\mu\text{m}$ . Los diámetros medios de masa aerodinámicos de los polvos variarán típicamente de aproximadamente 0,1-5,0  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 0,2-5,0  $\mu\text{m}$  de DMMA, o de aproximadamente 1,0-4,0  $\mu\text{m}$  de DMMA, o de aproximadamente 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ . Los diámetros aerodinámicos pequeños pueden conseguirse por una combinación de condiciones de secado por pulverización optimizadas y selección y concentración de excipientes.

Los polvos de la presente invención también pueden caracterizarse por sus densidades. El polvo poseerá generalmente una densidad en volumen de aproximadamente 0,1 a 10 g/centímetros cúbicos, o de aproximadamente 0,1-2 g/centímetros cúbicos, o de aproximadamente 0,15-1,5 g/centímetros cúbicos. En una

realización de la presente invención, los polvos tienen partículas grandes y mullidas con una densidad de menos de aproximadamente 0,4 g/cm<sup>3</sup> y un DMM entre 5 y 30 micrómetros. Cabe señalar que la relación del diámetro, densidad y el diámetro aerodinámico puede determinarse por la siguiente fórmula (Gonda, "Physico-chemical principles in aerosol delivery", en Topics in Pharmaceutical Sciences 1991, Crommelin, D.J. y K.K. Midha, Eds., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, págs. 95-117, 1992).

Los polvos pueden tener un contenido de humedad por debajo de aproximadamente el 20% en peso, normalmente por debajo de aproximadamente el 10% en peso, o por debajo de aproximadamente el 5% en peso. Dichos sólidos que contienen una baja humedad tienden a mostrar una mayor estabilidad tras su envasado y almacenaje.

Además, los procedimientos de secado por pulverización y los estabilizadores descritos en este documento son eficaces generalmente para proporcionar composiciones altamente dispersables. Generalmente, la dosis emitida (DE) de estos polvos es mayor del 30%, y normalmente mayor del 40%. En algunas realizaciones, la DE de los polvos de la presente invención es mayor del 50%, 60%, 70%, o superior.

Una característica particular que se refiere normalmente a las características de dispersabilidad y manejo mejoradas es la rugosidad del producto. La rugosidad es la proporción del área específica (por ejemplo, como se mide por BET, adsorción superficial molecular, un otra técnica convencional) y el área superficial calculada a partir de la distribución del tamaño de partícula (por ejemplo, como se mide por un analizador del tamaño de partículas por sedimentación centrífuga, Horiba Capa 700) y la densidad de las partículas (por ejemplo, como se mide por picnometría), asumiendo partículas esféricas no porosas. La rugosidad también puede medirse por permeametría al aire. Si se sabe que las partículas tienen una forma generalmente nodular, como es el caso en el secado por pulverización, la rugosidad es una medición del grado de plegado de la superficie. Esto puede verificarse por polvos hechos por la presente invención mediante el análisis por SEM. Una rugosidad de 1 indica que la superficie de la partícula es esférica y no porosa. Los valores de rugosidad mayores de 1 indican que la superficie de la partícula es no uniforme y está contorneada en al menos cierta medida, indicado los números mayores un mayor grado de no uniformidad. Los polvos de la presente invención típicamente tienen una rugosidad de al menos aproximadamente 2, tal como al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5, y puede variar de 2 a 10, tal como de 4 a 8, o de 4 a 6.

En algunas realizaciones de la invención, el área superficial de los polvos, medido por adsorción de nitrógeno, varía típicamente de aproximadamente 6 m<sup>2</sup>/g a aproximadamente 13 m<sup>2</sup>/g, tal como de aproximadamente 7 m<sup>2</sup>/g a aproximadamente 10 m<sup>2</sup>/g. A menudo las partículas tienen una estructura contorneada "arrugada" en lugar de una superficie esférica lisa.

Una realización particularmente preferida de la presente invención es una en la que al menos las regiones externas, incluyendo la superficie externa, de las partículas de polvo están en un estado vítreo amorfo. Se cree que cuando las partículas tienen un material de T<sub>g</sub> alta en sus superficies, el polvo será capaz de acumular cantidades considerables de humedad antes de reducir la T<sub>g</sub> hasta el punto de inestabilidad (T<sub>g</sub>-T<sub>s</sub> de menos de aproximadamente 10 °C).

Las composiciones descritas en este documento típicamente poseen buena estabilidad con respecto a tanto la estabilidad química como la estabilidad física, es decir, el rendimiento del aerosol con el tiempo. Generalmente, con respecto a la estabilidad química, el conjugado de GLP-1 contenido en la composición se degradará no más de aproximadamente el 10% tras el secado por pulverización. Es decir, el polvo generalmente posee al menos aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 97% o más de la proteína farmacéutica intacta.

Con respecto al rendimiento del aerosol, las composiciones de la presente invención se caracterizan generalmente por una gota en dosis emitida de no más de aproximadamente el 20%, o no más de aproximadamente el 15%, o no más de aproximadamente el 10%, cuando se almacenan en condiciones ambientales durante un periodo de tres meses.

Como alternativa, los conjugados poliméricos de GLP-1 de la presente invención pueden formularse en microestructuras perforadas. Dichas microestructuras, y procedimientos de su fabricación, se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.565.885.

En resumen, dichas microestructuras perforadas generalmente comprenden una matriz estructural que muestra, define o comprende vacíos, poros, defectos, huecos, espacios, espacios intersticiales, aperturas, perforaciones u orificios. La forma absoluta (a diferencia de la morfología) de la microestructura perforada no es generalmente importante y cualquier configuración global que proporcione las características deseadas se contempla como que está dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, algunas realizaciones comprenden aproximadamente formas microesféricas.

#### Administración

Los conjugados de GLP-1 de la invención pueden administrarse por cualquiera de varias vías, incluyendo, sin

limitación, oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo transdérmica, aerosol, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), intratecal y pulmonar. Las formas preferidas de administración incluyen parenteral y pulmonar. Los tipos de formulación adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones lista para su inyección, polvos secos para una combinación con un disolvente antes de usar, suspensiones listas para su inyección, composiciones insolubles secas para su combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y concentrados líquidos para diluir antes de su administración, entre otros.

Los datos *in vivo* proporcionados en el Ejemplo 8 demuestran el efecto reductor de la glucosa en sangre de un conjugado de GLP-1 liberable ejemplar de la invención, así como su capacidad para proporcionar un efecto de este tipo durante un periodo de tiempo prolongado, es decir, durante más de 48 horas, cuando se administra por inyección. Por el contrario, el GLP-1 nativo experimenta un aclaramiento rápido. Véase, por ejemplo, las figuras 13 y 14.

En algunas realizaciones preferidas, las composiciones del conjugado polimérico de GLP-1 se administran por vía pulmonar, preferiblemente por inhalación. Los datos *in vivo* para apoyar este aspecto se proporcionan en los Ejemplos 25 y 26, en los que se administraron ciertos conjugados de GLP-1 liberables ejemplares por administración intratraqueal. Ambos conjuntos de datos indican que la administración pulmonar de un conjugado polimérico de GLP-1 liberable es eficaz para dar como resultado la supresión de los niveles de glucosa en sangre durante un periodo de tiempo sustancialmente prolongado al que se observó para el GLP-1 no conjugado.

Las composiciones de polvo seco que se describen en este documento pueden administrarse por vía pulmonar usando cualquier inhalador de polvo secado adecuado (IPS), es decir, un dispositivo inhalador que utiliza la respiración del paciente como un vehículo para transportar el fármaco en polvo seco a los pulmones. Se incluyen los dispositivos de inhalación de polvo seco de Nektar Therapeutics como se describe en Patton, J. S., y col., Patente de Estados Unidos N° 5.458.135, 17 de octubre de 1995; Smith, A. E., y col., Patente de Estados Unidos N° 5.740.794, 21 de abril de 1998; y en Smith, A. E., y col., Patente de Estados Unidos N° 5.785.049, 28 de julio de 1998. Cuando se administran usando un dispositivo de este tipo, el medicamento en polvo se aloja en un receptáculo que tiene una punta perforable u otra superficie de acceso, preferiblemente un paquete o cartucho blister, en el que el receptáculo puede contener una unidad de dosificación unitaria o múltiples unidades de dosificación. Se describen procedimientos convenientes para rellenar grandes números de cavidades (es decir, paquetes de dosis unitaria) con dosis medidas del medicamento de polvo seco, por ejemplo, en Parks, D. J., y col., Publicación de Patente Internacional WO 97/41031, 6 de noviembre de 1997.

Otros dispositivos de dispersión de polvo seco para la administración pulmonar de polvos secos incluyen los descritos, por ejemplo, en Newell, R. E., y col, Patente Europea N° EP 129985, 7 de septiembre de 1988); en Hodson, P. D., y col., Patente Europea N° EP472598, 3 de julio de 3 de 1996; en Cocozza, S., y col., Patente Europea N° EP 467172, 6 de abril de 1994, y en Lloyd, L. J. y col., Pat. de Estados Unidos N° 5.522.385, 4 de junio de 1996. Además, adecuados para la administración de polvos secos de la presente invención son los dispositivos de inhalación, tales como el Astra-Draco "TURBUHALER". Este tipo de dispositivo se describe con detalle en Virtanen, R., Pat. de Estados Unidos N° 4.668.218, 26 de mayo de 1987; en Wetterlin, K., y col., Pat. de Estados Unidos N° 4.667.668, 26 de mayor de 1987; y en Wetterlin, K., y col., Pat. de Estados Unidos N° 4.805.811, 21 de febrero de 1989. Otros dispositivos adecuados incluyen inhaladores de polvo seco, tales como Rotahaler™ (Glaxo), Discus™ (Glaxo), el inhalador Spiros™ (Dura Pharmaceuticals), y el Spinhaler™ (Fisons). Además, son adecuados los dispositivos que emplean el uso de un pistón para proporcionar aire para un medicamento incorporador de polvo, un medicamento de elevación de un tamiz vehículo pasando aire a través del tamiz, o mezclando el aire con el medicamento en polvo en una cámara de mezcla con la introducción posterior del polvo al paciente a través de la boquilla del dispositivo, tal como se describe en Mulhauser, P., y col., Pat. de Estados Unidos N° 5.388.572, 30 de septiembre de 1997.

Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse usando un inhalador a presión de dosis medida (IND), por ejemplo, el inhalador de dosis medida Ventolin™, que contiene una solución o una suspensión del fármaco en un propulsor líquido farmacéuticamente inerte, por ejemplo, un clorofluorocarbono o fluorocarbono, como se describe en Laube, y col., Pat. de Estados Unidos N° 5.320.094, y en Rubsamen, R. M., y col., Pat. de Estados Unidos N° 5.672.581.

Como alternativa, las composiciones descritas en este documento pueden disolverse o suspenderse en un disolvente, por ejemplo, agua o solución salina, y pueden administrarse por nebulización. Los nebulizadores para administrar una solución aerosolizada incluyen el AERx™ (Aradigm), el Ultravent™ (Mallinkrodt), el Pari LC Plus™ o el Pari LC Star™ (Pari GmbH, Alemania), el DeVilbiss Pulmo-Aide, y el Acorn II™ (Marquest Medical Products).

Se proporciona un procedimiento, comprendiendo el procedimiento administrar un conjugado a un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un conjugado polimérico de GLP-1 como se proporciona en este documento. La administración puede realizarse por cualquiera de las vías descritas en este documento. El procedimiento puede usarse para tratar a un paciente que padece una afección que es sensible al tratamiento con GLP-1 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

Como se ha indicado previamente, el procedimiento de administrar un conjugado polimérico de GLP-1, como se proporciona en este documento, puede usarse para tratar a un paciente que tiene una afección que puede remediarse o prevenirse mediante la administración de GLP-1. Los sujetos que necesitan el tratamiento con GLP-1 o un conjugado de GLP-1 de la invención incluyen aquellos con diabetes no dependientes de insulina, diabetes dependientes de insulina, ictus, infarto de miocardio, obesidad, cambios catabólicos después de una cirugía, dispepsia funcional y síndrome del intestino irritable. También se incluyen sujetos que requieren un tratamiento profiláctico, por ejemplo, sujetos en riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina. Los sujetos adicionales incluyen aquellos con una tolerancia alterada a la glucosa o glucosa en ayunas alterada.

Ciertos conjugados de la invención, por ejemplo, los conjugados liberables, incluyen aquellos eficaces para liberar el resto GLP-1, por ejemplo, por hidrólisis, durante un periodo de varias horas o incluso días (por ejemplo, 2-7 días, 2-6 días, 3-6 días, 3-4 días) cuando se evalúan en un modelo *in vivo* adecuado. Los conjugados liberables de la invención incluyen aquellos eficaces para niveles de glucosa en sangre inferiores durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, durante al menos aproximadamente 8 horas, durante al menos aproximadamente 10 horas, durante aproximadamente 1-3 días o así sucesivamente, o durante aproximadamente 1-2,5 días.

En vista de lo anterior, la glucosa en sangre del paciente puede alcanzar un mínimo en un tiempo que varía de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 30 horas, tal como de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas, de 6 horas a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, después de la administración. En caso de la administración pulmonar, la glucosa en sangre del paciente puede alcanzar un mínimo en un tiempo que varía de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 12 horas, tal como de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas o de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas. En el caso de la administración subcutánea, la glucosa en sangre del paciente alcanza un mínimo en un tiempo que varía de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 30 horas, tal como de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas, de 6 horas a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas.

La glucosa en sangre del paciente puede alcanzar un mínimo que varía de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 60%, tal como de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 55%, del 35% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 45%, de glucosa en sangre antes de la administración, por ejemplo, por administración subcutánea o pulmonar. Como ejemplo, el paciente puede tener un nivel de glucosa en sangre de menos de aproximadamente 126 mg/dl, tal como menos de aproximadamente 120 mg/dl, menos de aproximadamente 110 mg/dl, o menos de 100 mg/dl, después de la administración, por ejemplo, por administración subcutánea o pulmonar.

El paciente puede tener una reducción de glucosa en sangre hasta aproximadamente 160 horas, tal como hasta aproximadamente 140 horas, hasta aproximadamente 120 horas, hasta aproximadamente 100 horas, hasta aproximadamente 80 horas, hasta aproximadamente 60 horas, hasta aproximadamente 40 horas, hasta aproximadamente 24 horas, o hasta aproximadamente 12 horas, después de la administración. En el caso de la administración pulmonar, el paciente puede tener una reducción de la glucosa en sangre hasta aproximadamente 60 horas, hasta aproximadamente 50 horas, hasta aproximadamente 40 horas, hasta aproximadamente 30 horas, hasta aproximadamente 24 horas, o hasta aproximadamente 12 horas.

La dosis real del conjugado de GLP-1 que se va a administrar variará dependiendo de la edad, el peso y la condición general del sujeto, así como la gravedad de la afección que se va a tratar, el juicio del profesional sanitario y el conjugado que se va a administrar. Las cantidades terapéuticamente eficaces se conocen por los expertos en la técnica y/o se describen en los textos de referencia y la bibliografía pertinente. Generalmente, un conjugado de la invención se administrará de tal forma que los niveles en plasma de un resto GLP-1 estén dentro de un intervalo de aproximadamente 5 picomoles/litro a aproximadamente 200 picomoles/litro.

En base al peso, una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz de un conjugado de GLP-1 como se describe en este documento variará de aproximadamente 0,01 mg por día a aproximadamente 1000 mg por día para un adulto. Por ejemplo, las dosis pueden variar de aproximadamente 0,1 mg por día a aproximadamente 100 mg por día, o de aproximadamente 1,0 mg por día a aproximadamente 10 mg/día. Basándose en la actividad, las dosis correspondientes pueden calcularse en base a las unidades internacionales por un experto en la técnica.

La dosificación unitaria de cualquier conjugado determinado (de nuevo, tal como se proporciona como parte de una composición farmacéutica) puede administrarse en una diversidad de programaciones de dosificación dependiendo del juicio del médico, las necesidades del paciente, y así sucesivamente. La programación de dosificación específica se conocerá por los expertos en la técnica en la técnica o puede determinarse experimentalmente usando procedimientos de rutina. Las programaciones de dosificación ejemplares incluyen, sin limitación, la administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha conseguido el punto de valoración clínico, la dosificación de la composición se detiene.

**Experimental**

5 La práctica de la invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de la síntesis orgánica, y similares, que están dentro del conocimiento de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Los reactivos y los materiales están disponibles en el mercado, a menos que se indique específicamente otra cosa. Véase, por ejemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 1992), anteriormente.

10 En los siguientes ejemplos, se han hecho esfuerzo para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, la temperatura está en grados C y la presión es a o casi presión atmosférica a nivel del mar.

15 Aunque se hará referencia a otras abreviaturas conocidas por un experto en la técnica, se usarán otros reactivos y materiales, y se usarán otros procedimientos conocidos por un experto en la técnica, la siguiente lista y descripción de procedimientos se proporciona por razones de conveniencia.

**ABREVIATURAS:**

mPEG-SPA	propionato de mPEG-succinimidilo
mPEG-SBA	butanoato de mPEG-succinimidilo
mPEG-OPSS	disulfuro de mPEG-ortopiridilo
mPEG-MAL	mPEG-maleimida, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{MAL}$
mPEG-SMB	$\alpha$ -metilbutanoato de mPEG-succinimidilo, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{succinimida}$
mPEG-ButyrALD	$\text{H}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$
mPEG-PIP	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$ -piperidin-4-ona
mPEG-CM	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$
anh.	anhidro
CV	volumen en columna
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
$\text{NaCNBH}_3$	cianoborohidruro sódico
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico
RMN	resonancia magnética nuclear
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DI	desionizado
PM	peso molecular
K o kDa	kilodaltons
SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
FPLC	cromatografía líquida rápida de proteínas
SDS-PAGE	dodecil sulfato sódico-electroforesis en gel de poliacrilamida
MALDI-TOF	ionización por desorción láser asistida por matriz de tiempo de vuelo
TLC	cromatografía de Capa Fina
THF	tetrahidrofurano

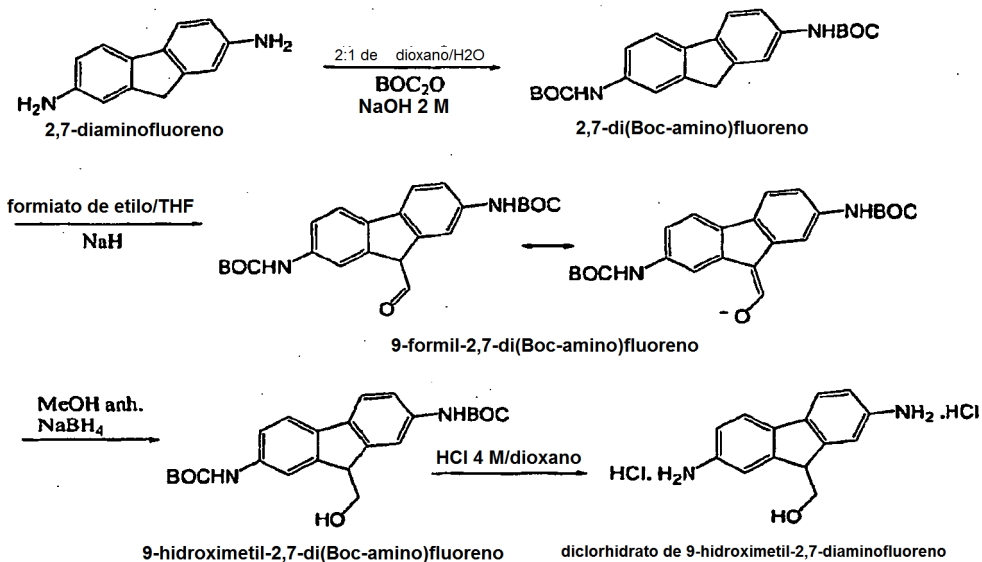
20 **MATERIALES:** Todos los reactivos de PEG a los que se hace referencia en los ejemplos adjuntos están disponibles en el mercado, a menos que se indique otra cosa. El Péptido-1 similar al Glucagón (GLP-1 (7-36) $\text{NH}_2$ ), "GLP-1" usado en estos Ejemplos se adquirió en American Peptide Company (Sunnyvale, CA).

25 Sólo algunos de los siguientes Ejemplos se refieren a la invención que se reivindica. Aquellos que no se reivindican se proporcionan únicamente con fines de referencia.

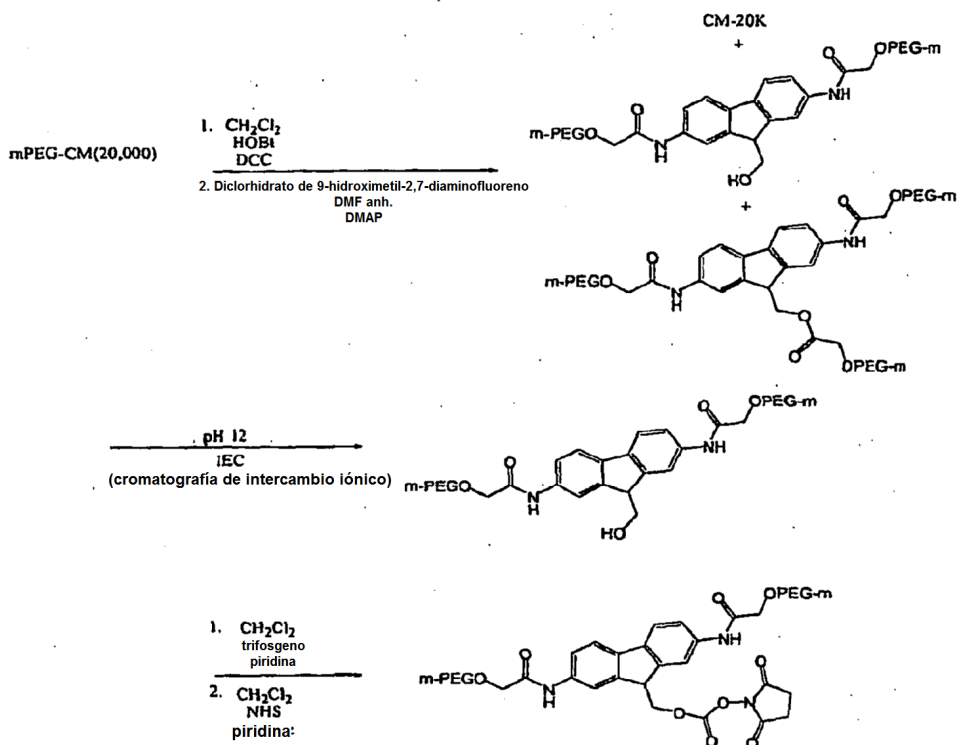
Ejemplo 1

5 Preparación de N-(di(mPEG(20.000)oximetilcarbonilamino)fluoren-9-ilmetoxicarboniloxi)succinimida para PEGilación reversible de GLP-1

Esquema 1



10



A. Preparación de 2,7-di(Boc-amino)fluoreno

15 En una atmósfera de argón, se disolvió 2,7-diaminofluoreno (2,45 g, 12,5 mmol) en 1,4-dioxano (28 ml). Se añadieron sucesivamente agua desionizada (14 ml), NaOH 2 M (2,2 equiv., 27,5 mmol, 13,8 ml) y dicarbonato de di-terc-butilo ( $BOC_2O$ ) (2,5 equiv., 31,3 mmol, 6,82 g). La reacción se agitó vigorosamente durante 20 horas a

temperatura ambiente. El producto precipitó en forma de un sólido de color pardo. La reacción se interrumpió mediante la adición de agua y la acidificación a pH 3 con  $\text{KHSO}_4$  1 M. El producto se extrajo con cloroformo (3 x 400 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 1/2 de salmuera saturada, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida: 60 Å de gel de sílice eluyendo con metanol al 1% en cloroformo. El sólido purificado de color amarillo (5,1 g, ~99%) fue puro por TLC (tinción con ninhidrina).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,7 (s a, 2H, NH uretano); 7,6 (d, 2H, Ar); 7,2 (d, 2H, Ar); 6,5 (s, 2H, Ar); 3,8 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,5 (s, 18H, Boc).

#### B. Preparación de 9-formil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno

Se disolvió 2,7-di(Boc-amino)fluoreno purificado (5 g, 12,5 mmol) (preparado a partir de la etapa A, anterior) en formiato de etilo (50 ml) y THF anhidro (60 ml) con calentamiento suave. (Nota: el formiato de etilo se almacenó sobre  $\text{K}_2\text{CO}_3$  para retirar el ácido fórmico). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió en porciones hidruro sódico al 60% en aceite mineral (5,5 equiv., 69 mmol, 2,75 g). La reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y después se calentó a 50 °C después del ajuste con un condensador de reflujo. Después de dos horas, la reacción se enfrió en un baño de hielo y se interrumpió mediante la adición lenta de agua desionizada (50 ml). La capa acuosa se ajustó a pH 5 con ácido acético glacial y se extrajo con acetato de etilo (2 x 400 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto (sólido de color pardo oscuro) se purificó por cromatografía ultrarrápida: 60 Å de gel de sílice en gradiente de elución por etapas de metanol al 1-5% en cloroformo. Rendimiento (4,8 g, ~90%) de un sólido de color amarillo a pardo, dependiendo de la pureza.  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm) 11,0 (s, 0,9H, enol); 9,3 (2 s, 1,9H, NH uretano); 7,2-8,3 (m, Ar,  $\text{C}^{10}$  H enol); 6,5 (2 s, 0,1 H, NH uretano); 4,1 (m, 0,3H, CH); 1,5 (s, 18H, Boc).

#### C. Preparación de 9-hidroxietil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno

Se disolvió 9-formil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno (0,47 g, 1,1 mmol) en metanol anhidro (MeOH) (5 ml) en una atmósfera de argón. Se añadió  $\text{NaBH}_4$  (1,2 equiv., 1,3 mmol, 0,05 g) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante cinco horas. La reacción se diluyó con agua desionizada y se acidificó a pH 5 con ácido acético glacial. La reacción se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml) y las capas orgánicas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (4 x 20 ml) y salmuera (3 x 20 ml). Las capas orgánicas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se evaporaron. El producto en bruto, un sólido de color naranja, se purificó por cromatografía ultrarrápida: 60 Å de gel de sílice en gradiente de elución de metanol al 1-5% metanol en cloroformo (gradiente de elución alternativo con acetato de etilo al 15-20% en diclorometano). El producto era un sólido de color amarillo (0,39 g, 83%).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 7,9 (s, 0,5H, NH uretano); 7,7 (s, 2H, Ar); 7,6 (d, 2H, Ar); 7,4 (d, 2H, Ar); 4,0 (m, 1H, CH); 3,9 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,6 (s, 18H, Boc).

#### D. Preparación de diclorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno

Se disolvió 9-hidroximetil-2,7-di(Boc-amino)fluoreno (0,39 g, 0,9 mmol) en 1,4-dioxano. A 0 °C se añadió HCl concentrado (2,5 ml) y la reacción se agitó durante dos horas a 0 °C y durante una hora a temperatura ambiente. Los disolventes de reacción se retiraron a presión reducida (45 °C). El producto se disolvió en metanol y se evaporó (2 veces). El producto se disolvió en metanol (8 ml) y se precipitó mediante la adición lenta de éter dietílico y se enfrió (repetición). El producto era un sólido de color rojo-naranja (0,25 g, 91%) que mostró una única mancha por TLC (85:15:3 de cloroformo/metanol/ácido acético, tinción con ninhidrina).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 8,1 (d, 2H, Ar); 7,8 (s, 2H, Ar); 7,5 (d, 2H, Ar); 4,3 (t, 1H, CH); 4,0 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ )

#### E. Preparación de 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)oximetilcarbonilamino)fluoreno

Se destiló azeotrópicamente mPEG-CM(20.000) (mPEG-CM que tenía PM = 19.455; 20 g, 1,03 mmol, 3,5 equiv.), en tolueno anhidro (80 ml) a presión reducida a 60 °C en un evaporador rotatorio. Los sólidos se disolvieron en diclorometano anhidro (40 ml) en una atmósfera de argón seguida de la adición de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) anhidro (3,5 equiv., 1,03 mmol, 139 mg) y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (3,7 equiv., 1,09 mmol, 224 mg). En un matraz separado se disolvieron diclorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (1 equiv., 0,294 mmol, 88 mg) y 4-dimetilaminopiridina (2,2 equiv., 0,65 mmol, 79 mg) en DMF anhidra (2,5 ml). Después de agitar la reacción de DCC durante varios minutos (5-15 minutos), la solución en DMF de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno se transfirió cuantitativamente a la reacción de DCC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 27 horas antes de que el disolvente se evaporara a presión reducida. El jarabe espeso se disolvió en alcohol isopropílico seco (400 ml, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó después de un periodo de reposo a temperatura ambiente. Se añadió más cantidad de alcohol isopropílico (100 ml) mientras se agitaba a 0 °C durante 30 minutos. El precipitado se filtró y se lavó con 7:3 de alcohol isopropílico/éter dietílico frío (80 ml) y éter dietílico. El producto en bruto (polvo de color amarillo pálido, 9-(mPEG(20.000)metilester)-metil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno) se secó a alto vacío (rendimiento: 18,3 g).

En una atmósfera de argón, el producto en bruto (18,3 g) se disolvió en agua desionizada y se ajustó a pH  $12 \pm 0,1$  con NaOH 1 M. La mezcla de reacción de hidrólisis se agitó a temperatura ambiente durante tres horas. El pH se ajustó a 3,0 con ácido fosfórico al 10%. (La solución acuosa se filtró a través de un lecho de celite y se aclaró con

agua). Se disolvió NaCl (60 g) en la solución acuosa y después se extrajo con diclorometano (2 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en agua desionizada y se desaló con una resina de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico de la solución de PEG se realizó sobre DEAE-sefarosa (0,9 l) eluyendo con agua. Se recogieron las fracciones que contenían PEG. El producto purificado (polvo de color amarillo pálido) estaba ausente de mPEG-CM(20.000) (análisis por HPLC). Rendimiento: 7,3 g, 64% (que representaba la cantidad total de material de PEG recuperado), una sustitución del 75% o mejor (que representaba el porcentaje de PEG, de la cantidad recuperada, que tenía la funcionalidad deseada). <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) 8,9 (s, 2H, NH amida); 7,9 (s, 2H, Ar); 7,7 (m, 4H, Ar); 4,1 (m, 5H, CH<sub>2</sub>C=O, CH); 4,0 (d, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,6 (s, estructura de PEG); 3,3 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>).

#### F. N-{di(mPEG(20.000)oximetilcarbonilamino)fluoren-9-ilmetoxicarbonilo}succinimida

Se destiló azeotrópicamente 9-hidroximetil-2,7-di(mPEG(20.000)-metilamida)fluoreno (0,5 g, 0,013 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 ml) a presión reducida a 50 °C en un evaporador rotatorio. El sólido se disolvió en diclorometano anhidro (2 ml, "CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>") seguido de la adición de trifosgeno. (Se usó con cuidado para atrapar el exceso de gas fosgeno de la reacción con purgador base) (1,4 equiv., 0,018 mmol, 5 mg). Después de varios minutos, se añadió piridina anhidra (2 equiv., 0,026 mmol, 2 µl de piridina en diclorometano [2 µl de piridina/50 µl de diclorometano]). En una hora y media la mayor parte del disolvente de reacción y el exceso de fosgeno (se usó un purgador base en ventilación) se evaporó con calentamiento suave (40 °C). El jarabe se disolvió en diclorometano anhidro (2 ml) seguido de la adición de N-hidroxisuccinimida (5,3 equiv., 0,068 mmol, 8 mg, "NHS") y piridina anhidra (3,2 equiv., 0,041 mmol, 83 µl de la solución anterior (2:50) en diclorometano). Después de una hora, el disolvente se evaporó en una corriente de argón. El jarabe se disolvió en alcohol isopropílico anhidro y precipitó a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y se lavó con alcohol isopropílico frío y éter dietílico. Los disolventes residuales se evaporaron al vacío para dar un polvo de color amarillo muy pálido. Rendimiento: 0,4 g, 80%, sustitución al 73% de NHS carbonato por HPLC. <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) 8,9 (s, 2H, NH amida); 7,9 (s, 2H, Ar); 7,7 (m, 4H, Ar); 4,7 (d, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,3 (t, 1H, CH); 4,1 (s, 4H, CH<sub>2</sub>C=O); 2,8 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> NHS).

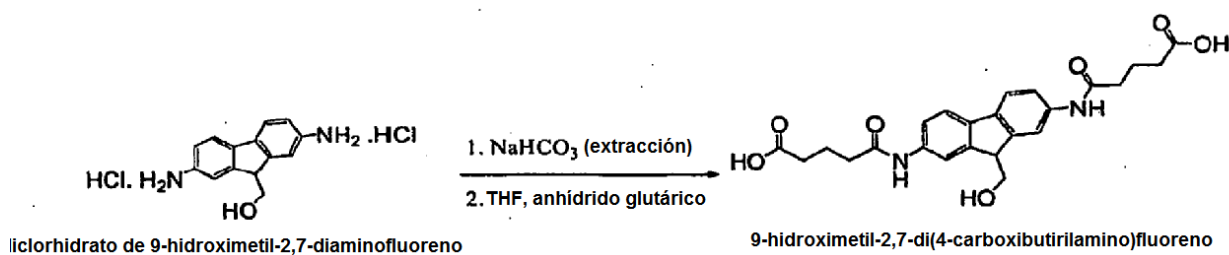
Usando este mismo procedimiento, los reactivos polímeros que tienen otros pesos moleculares pueden prepararse sustituyendo un reactivo polimérico de mPEG-CM que tiene un peso molecular distinto de 20.000 daltons.

#### Ejemplo 2

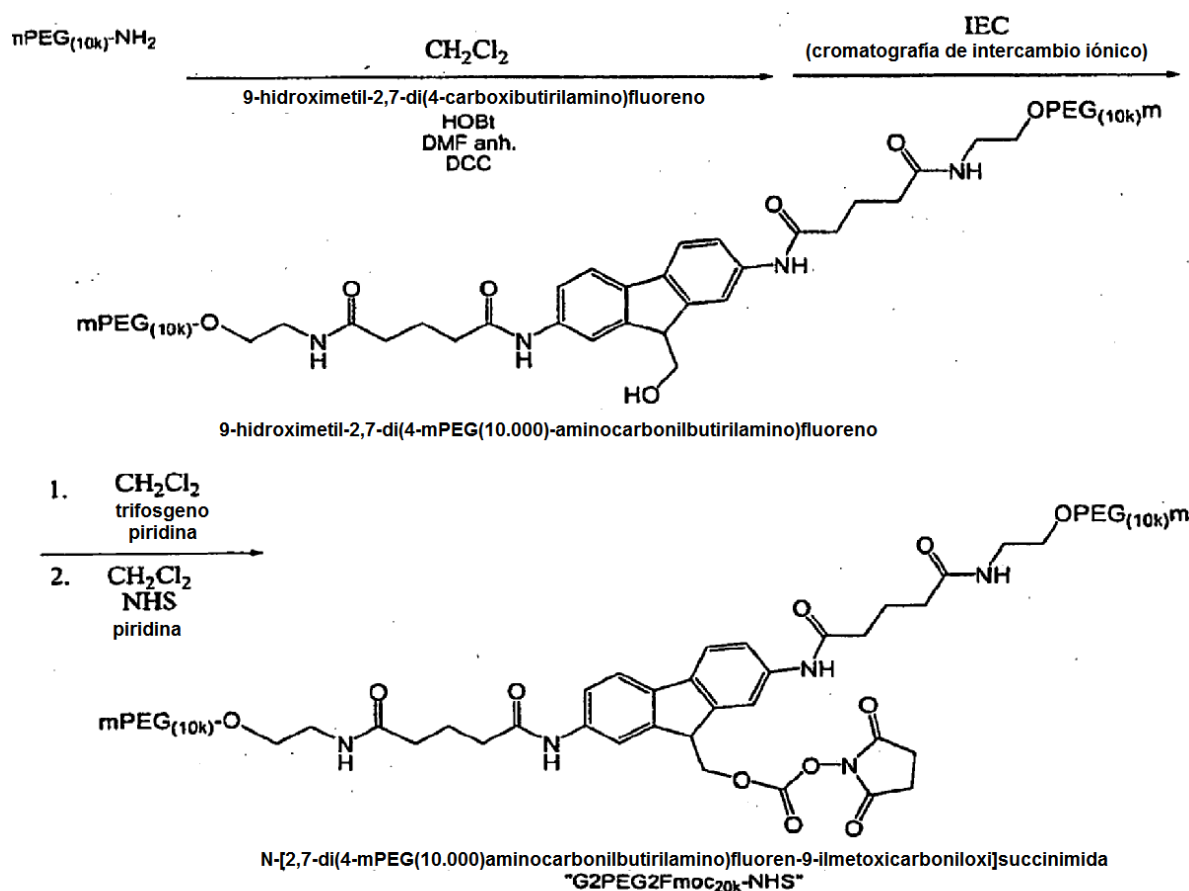
#### Preparación de N-[2,7di(4-mPEG(10.000)aminocarbonilbutirilamino)fluoren-9-ilmetoxicarbonilo]succinimida ("G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS")

La síntesis de mPEG(10.000)aminocarbonilbutirilamino)fluoren-9-ilmetoxicarbonilo]succinimida se representa esquemáticamente en el Esquema 2 que se muestra a continuación.

#### Esquema 2







#### A. 9-Hidroximetil-2,7-di(4-carboxibutirilamino)fluoreno

5

En una atmósfera de argón, se disolvió diclorhidrato de 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (preparación descrita en las etapas A a D en el Ejemplo 1) en agua desionizada y se ajustó a pH 8 con  $\text{NaHCO}_3$  saturado. La mezcla se diluyó a la mitad con salmuera y el precipitado se extrajo con acetato de etilo. Las capas de acetato de etilo se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron para 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (polvo de color pardo, rendimiento aislado al 84%).

10

Se disolvió 9-hidroximetil-2,7-diaminofluoreno (0,38 g, 1,7 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF) (10 ml) y se añadió anhídrido glutárico (97%, 2,2 equiv., 3,7 mmol, 0,435 g). La reacción se agitó durante 4,5 horas y la ausencia de amina se confirmó por TLC (tinción con ninhidrina, 90:10:3 de acetato de etilo/metanol/ácido acético). La mezcla de reacción se diluyó con hexanos (10 ml), se filtró y se lavó con 1:1 de THF/hexanos y después hexanos. El producto en bruto se disolvió en una cantidad mínima de metanol (1 ml) y THF (10 ml) y se precipitó con adición de hexanos (10 ml). La mezcla se enfrió (4 °C), se filtró y se lavó con 1:1 de THF/hexanos y después hexanos. El rendimiento fue de 0,59 g (77%) de un polvo de color amarillo-naranja.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 7,9 (s, 2H, Ar); 7,7 (d, 2H, Ar); 7,5 (dd, 2H, Ar); 4,0 (t, 1H, CH); 3,9 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,5 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 2,4 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 2,0 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

15

20

#### B. 9-Hidroximetil-2,7-di(4-mPEG(10.000)-aminocarbonilbutirilamino)fluoreno

Se destiló azeotrópicamente mPEG-NH<sub>2</sub>(10.000) ( $M_n = 10.200$ ; purificado por cromatografía, 12,75 g, 1,25 mmol) en tolueno anhidro (100 ml) a presión reducida a 50 °C en un evaporador rotatorio. Los sólidos se disolvieron en diclorometano anhidro (50 ml) en una atmósfera de argón. Se añadió cuantitativamente una solución de 9-hidroximetil-2,7-di(ácido amidoglutárico)fluoreno (1 equiv., 0,5 mmol, 0,225 g) y N-hidroxibenzotriazol (HOBT) anhidro (2,2 equiv., 1,1 mmol, 149 mg) en DMF anhidra (5 ml) a la solución de PEG (2,5 ml de DMF para aclarar). Después, a la solución de reacción se le añadió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (2,4 equiv., 1,2 mmol, 248 mg). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de evaporar el disolvente a presión reducida. El jarabe espeso se disolvió en alcohol isopropílico seco (500 ml, adición lenta) con calentamiento suave. El producto de PEG precipitó después de un periodo de reposo a temperatura ambiente. El precipitado se enfrió a 10 °C durante diez minutos, se filtró y se lavó con alcohol isopropílico frío (200 ml) y después con éter dietílico (200 ml). El producto en bruto (polvo de color blanquecino) se secó a alto vacío y después se disolvió en agua desionizada. La cromatografía de intercambio iónico de la solución de PEG se realizó sobre un medio POROS (0,1 l, Boehringer-Mannheim, GmbH,

25

30

Mannheim, Alemania) eluyendo con agua. Las fracciones que contenían PEG neutro se recogieron. El producto purificado no contenía mPEG-NH<sub>2</sub>(10.000) (análisis por HPLC). Rendimiento de 5,5 g, al 53%, sustitución al 85% o mejor. <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) 8,6 (s, 2H, ArNH amida); 7,9 (s, 2H, Ar); 7,6 (m, 4H, Ar); 6,4 (s a, 2H, NH amida); 4,1 (m, 1H, CH); 4,0 (d, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,6 (s, estructura de PEG); 3,3 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 2,4 (t, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,3 (t, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,0 (m, 4H, CH<sub>2</sub>).

### C. N-[2,7-di(4-mPEG(10.000)aminocarbonilbutirilamino)fluoren-9-il metoxicarboniloxi]succinimida

Se destiló azeotrópicamente 9-hidroximetil-2,7-di(4-mPEG(10.000)-aminocarbonilbutirilamino)fluoreno (5,3 g, 0,25 mmol) en acetonitrilo anhidro (100 ml) a presión reducida a 50 °C en un evaporador rotatorio. El sólido se disolvió en diclorometano anhidro (27 ml) seguido de la adición de trifosgeno (1,4 equiv., 0,36 mmol, 106 mg). (Se usó con cuidado para atrapar el exceso de gas fosgeno de la reacción con purgador base). Después de varios minutos, se añadió piridina anhidra (2 equiv., 0,51 mmol, 41 µl). Después de una hora y media, la mayor parte del disolvente de reacción y el exceso de fosgeno (se usó un purgador base en ventilación) se evaporó con calentamiento suave (40 °C). El jarabe se disolvió en diclorometano anhidro (15 ml) seguido de la adición de N-hidroxisuccinimida (5,3 equiv., 1,35 mmol, 155 mg, "NHS"). Después de 15 minutos, se añadió piridina anhidra (3,2 equiv., 0,81 mmol, 66 µl). La reacción se agitó durante dos horas y el disolvente se evaporó a presión reducida. El jarabe se disolvió en alcohol isopropílico anhidro (200 ml) y se precipitó a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y se lavó con alcohol isopropílico frío y éter dietílico (150 ml que contenían 10 mg de BHT). Los disolventes residuales se evaporaron al vacío para proporcionar un polvo de color blanquecino. Rendimiento de 5,1 g, al 95%, sustitución del ~70% de NHS carbonato por HPLC.

Se preparó otro reactivo polimérico usando este mismo procedimiento excepto que el mPEG-NH<sub>2</sub> (purificado por cromatografía) que tenía un peso molecular medio en peso de de aproximadamente 20.000 se sustituyó con mPEG-NH<sub>2</sub>(10.000). El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 40.000 Daltons. El nombre del reactivo polimérico preparado de esta manera es 9-hidroximetil-2,7-di(4-mPEG(20.000)-aminocarbonilbutirilamino)fluoreno (o "G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-NHS").

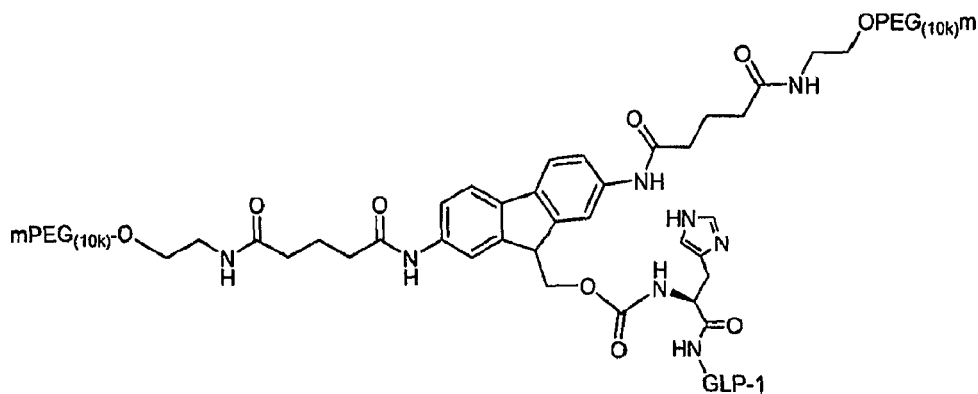
Otro reactivo polimérico se preparó usando este mismo procedimiento excepto que el mPEG-NH<sub>2</sub> (preparado a alta pureza usando procedimientos convencionales) que tenía un peso molecular medio en peso de aproximadamente 30.000 se sustituyó con mPEG-NH<sub>2</sub> (10.000). El reactivo polimérico resultante tenía un peso molecular total de aproximadamente 60.000 Daltons. El nombre del reactivo polimérico preparado de este modo es 9-hidroximetil-2,7-di(4-mPEG(30.000)-aminocarbonilbutirilamino)fluoreno (o "G2PEG2Fmoc<sub>60k</sub>-NHS").

### Ejemplo 3

#### Preparación de un conjugado polimérico de GLP-1 ejemplar que tiene un resto de PEG liberable unido a GLP-1:

##### Preparación de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1

Un reactivo polimérico ilustrativo, G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS, se unió covalentemente al extremo N de GLP-1, para proporcionar una forma de profármaco de la proteína en la que el resto PEG se une de forma liberable. La naturaleza de dos ramificaciones del reactivo polimérico proporciona un aumento en la estabilidad para el resto GLP-1 posterior a la administración, para proporcionar de este modo una formulación de liberación sostenida, por lo que el GLP-1 se libera del conjugado a través de hidrólisis para proporcionar el precursor de GLP-1 nativo o no modificado. A continuación se proporciona la estructura de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (en la estructura, "GLP-1" representa un residuo de GLP-1).

"G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1"

El reactivo polimérico, G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS, se preparó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

- 5 Se preparó una solución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente  $1,2276 \times 10^{-5}$  mol) (la pureza real de GLP-1 fue del 98,5% (por HPLC), y el contenido del péptido fue del 82,2%) en 25 ml de tampón acetato sódico 20 mM a pH 5,50 seguido de la adición de 876,8 mg de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS ( $3,0692 \times 10^{-5}$  mol) con agitación. La solución se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente, permitiendo de esta manera la formación de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, un conjugado PEGilado de GLP-1. Después, la mezcla de reacción se acidificó a pH 10 4,30 por HAC20 mM. La reacción se controló por análisis de SDS-PAGE (figura 1).

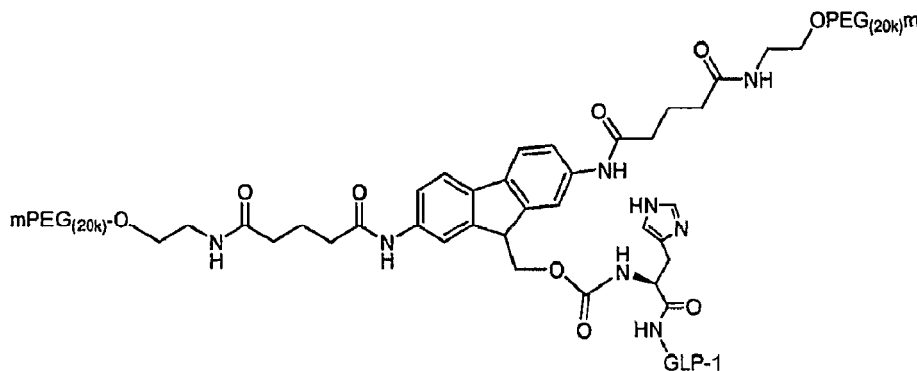
- El G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se purificó para obtener el conjugado monoPEGilado de GLP-1 mediante cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic (figura 2) usando una fase móvil de tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,30 (Solución A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (Solución B). La columna era una Columna Vantage L Laboratory Column VL (Millipore) rellena con un medio de intercambio iónico de alto rendimiento de SP Sepharose disponible en Amersham Biosciences. El caudal fue de 14 ml/min. La solución a purificar se cargó en primer lugar sobre la columna. Después, el producto cargado se eluyó por la fase 15 móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: para volúmenes de retención de 0 ml a 550 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 550 ml a 1041 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1041 ml a 1093 ml, 10% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1093 ml a 1338 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1338 ml a 1486 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1486 ml y superior, 0% de la fase móvil que contenía la solución B. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción que correspondía al pico G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (forma 20 monoPEGilada) a un volumen de retención de 689,3 ml se recogió (figura 2) y se liofilizó. El polvo liofilizado se disolvió en 25 ml de tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,3, y el proceso de purificación se repitió de nuevo en las mismas condiciones de cromatografía de intercambio catiónico. Rendimiento: 179,4 mg.

- El G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 purificado se analizó por SDS-PAGE (figura 3, Hilera 2) y HPLC de fase inversa (figura 4A). La naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en un medio acuoso [solución 50 mM de tris (hidroximetil)aminometano (Tris), pH 10, durante una noche a 50 °C] también se estudió tanto por análisis SDS-PAGE (figura 3, Hilera 3) como por HPLC de fase inversa (figura 4B), se observó a partir de la liberación completa del GLP-1 del conjugado. La columna fue una columna de 100 mm x 2,1 mm de DI Betasil C18 con partículas de 5 μm, disponible en Thermo Electron Corp. La HPLC de fase inversa usó una fase móvil de TFA al 0,1% en agua desionizada (solución C) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (solución D) realizada a 37 °C. El gradiente usado para la HPLC de fase inversa fue como se indica a continuación: para un tiempo de 0,00 a 20,00 minutos, 35% de la fase móvil que contenía la solución D; para un tiempo de 20,00 a 21,00 minutos, 55% de la fase móvil que contenía la solución D; para un tiempo de 21,00 a 23,00 minutos, 80% de la fase móvil que contenía la solución D; para un tiempo de 23,00 a 24,00 minutos, 80% de la fase móvil que contenía la solución D; para un tiempo de 24,00 a 25,00 minutos, 35% de la fase móvil que contenía la solución D; para un tiempo de 25,00 y superior, 35% de la fase móvil que contenía la solución D.

- El sitio de PEGilación N-terminal (His<sup>7</sup>) del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (una especie monoPEGilada) se confirmó por análisis MALDI-TOF tras la digestión de la proteasa del conjugado usando Endoproteinasa Glu-C de *Straphylococcus aureus* V8.

**Ejemplo 4****Preparación de un Conjugado Polimérico de GLP-1 Ejemplo que Tiene un Resto de PEG Liberable Unido a GLP-1:**

5

Preparación de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1**"G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1"**

10 El reactivo polimérico, G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-NHS, se preparó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

Se preparó una solución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente  $1,2276 \times 10^{-5}$  mol) (la pureza real de GLP-1 fue del 98,5% (por HPLC), y el contenido peptídico fue del 82,2%) en 25 ml de tampón acetato sódico 20 mM a pH 5,50 seguido de la adición de 1,4971 g de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-NHS ( $3,0692 \times 10^{-5}$  mol) con agitación. La solución se dejó en agitación durante 15 horas a temperatura ambiente, permitiendo de este modo la formación de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, un conjugado de GLP-1 PEGilado. La mezcla de reacción se acidificó a pH 4,00 por HAc 2 N seguido de dilución a 50 ml con tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,00.

15

El G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se purificó para obtener el conjugado monoPEGilado de GLP-1 mediante cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic (figura 5). La columna era una columna Vantage L Laboratory Column VL (Millipore) rellena con un medio de intercambio iónico de alto rendimiento de SP Sepharose (Amersham Biosciences). El caudal en la columna era de 14 ml/min. La fase móvil usada para la purificación consistió en tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,00 (solución A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,00 (solución B). La solución a purificar se cargó en primer lugar sobre la columna. Después, el producto cargado se eluyó mediante la fase móvil usando un gradiente. Se usó el siguiente gradiente: para volúmenes de retención de 0 ml a 550 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 550 ml a 1041 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1041 ml a 1093 ml, 10% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1093 ml a 1338 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1338 ml a 1486 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1486 ml y superiores, 0% de la fase móvil que contenía la solución B. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción que correspondía al pico mono G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en un volumen de retención de 668,4 ml se recogió (figura 5) y se liofilizó. El polvo liofilizado se disolvió en 25 ml tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,0, y el proceso de purificación se repitió de nuevo en las mismas condiciones de cromatografía de intercambio catiónico. La fracción de recolección a 668 ml se liofilizó.

25

30

35

El G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 purificado se analizó por SDS-PAGE (figura 6, Hilera 2). La naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en un medio acuoso La naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en un medio acuoso [solución 50 mM de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), pH 10, durante una noche a 50 °C] también se estudió por análisis SDS-PAGE (figura 6, Hilera 3), a partir del cual se observó la liberación completa de GLP-1 del conjugado.

40

**Ejemplo 5**

45 **Preparación de un conjugado polimérico de GLP-1 ejemplar que tiene un resto de PEG liberable unido a GLP-1:**

Preparación de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1

El reactivo polimérico liberable ejemplar, G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS, estaba unido covalentemente y de forma liberable a una porción de lisina de GLP-1, denominado en este documento como PEGilación "interna" de GLP-1.

5 Se preparó una solución de 30 mg de GLP-1 (nominalmente  $7,3658 \times 10^{-6}$  mol) (la pureza real de GLP-1 fue del 98,5% (por HPLC), y el contenido peptídico fue del 82,2%) en 24,5 ml de tampón carbonato sódico-bicarbonato 20 mM a pH 10,0 seguido de la adición de 276,3 mg de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-NHS ( $1,1049 \times 10^{-5}$  mol, preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2) con agitación. La solución se dejó en agitación durante diez minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se acidificó a pH 4,30 por HAc 2 N.

15 Para obtener el G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1 de forma mono-PEGilada, la mezcla de reacción se dividió en cinco alícuotas, y cada alícuota se purificó individualmente por cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic. La columna era una columna de 5 ml rellena de resina HiTrap™ SP HP, disponible en Amersham Biosciences, y el caudal en la columna fue de 5 ml/min. La fase móvil usada para la purificación fue tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,30 (solución A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (solución B). La fase móvil se realizó usando un gradiente. Se usó el siguiente reactivo: de 0 ml a 118,6 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 118,6 ml a 219,1 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 219,1 ml a 229,2 ml, 10% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 229,2 ml a 269,4 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 269,4 ml a 279,4 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 279,4 ml y superior, 0% de la fase móvil que contenía la solución B. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción de GLP-1 monoPEGilada que correspondía al pico G2PEG2-Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1 a un volumen de retención de 150,4 ml se recogió (figura 7) durante cada realización de purificación. Después, el G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1 purificado (en la forma de GLP-1 monoPEGilada) de cada realización de purificación se analizó por SDS-PAGE (figura 8). Las fracciones recogidas se combinaron y se liofilizaron. Rendimiento: 41 mg.

**Ejemplo 6**

30 **Preparación de un conjugado polimérico de GLP-1 ejemplar que tiene un resto de PEG liberable unido a GLP-1:**

Preparación de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1

35 El reactivo polimérico liberable ejemplar, G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-NHS, estaba unido covalentemente y de forma liberable a una porción de lisina de GLP-1, denominado en este documento como PEGilación "interna" de GLP-1.

40 Se preparó una solución de 50 mg de GLP-1 (nominalmente  $1,2276 \times 10^{-5}$  mol) (la pureza real de GLP-1 fue del 98,5% (por HPLC), y el contenido peptídico fue del 82,2%) en 45 ml de tampón carbonato sódico-bicarbonato 20 mM a pH 10,0 seguido de la adición de 898,0 mg de G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-NHS ( $1,8414 \times 10^{-5}$  mol, preparado como se describe en el Ejemplo 2) con agitación. La solución se dejó en agitación durante diez minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se acidificó a pH 4,00 por HAc 2 N.

45 Para obtener el G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 en forma monoPEGilada, la mezcla de reacción acidificada (50 ml) se dividió en 10 alícuotas, y cada 5 ml de alícuotas se purificó por cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic. La columna era una columna de 5 ml rellena con resina HiTrap™ SP HP, disponible en Amersham Biosciences, y el caudal en la columna fue de 5 ml/min. La fase móvil usada para la purificación fue tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,00 (A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,00 (B). La fase móvil se realizó usando un gradiente. Se usó el siguiente reactivo: 0 ml a 118,6 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 118,6 ml a 219,1 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 219,1 ml a 229,2 ml, 10% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 229,2 ml a 269,4 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 269,4 ml a 279,4 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 279,4 ml y superior, 0% de la fase móvil que contenía la solución B. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción de GLP-1 monoPEGilada que correspondía al pico G2PEG2-Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 a un volumen de retención de 158,3 ml se recogió (figura 9) durante cada realización de purificación. El G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 purificado (en forma de GLP-1 mono-PEGilado) de cada realización de purificación se analizó por SDS-PAGE (figura 10). Las fracciones recogidas se combinaron, se concentraron por ultrafiltración y se liofilizaron. Rendimiento: 187,5 mg.

60

**Ejemplo 7**

**Preparación de un conjugado polimérico de GLP-1 ejemplar que tiene PEG unido de forma estable a GLP-1**

Preparación de mPEG<sub>2k</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-HN-Lys-GLP-1

A diferencia de los conjugados de GLP-1 monoPEGilados que se han descrito en los Ejemplos 3 a 6, que pueden escindirse en condiciones fisiológicas para liberar GLP-1, el mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado descrito en este ejemplo es un conjugado de mPEG-GLP-1 formado por una unión amida estable en un residuo de lisina de GLP-1. A continuación, se describe un procedimiento de preparación.

Se preparó una solución de 100 mg de GLP-1 (nominalmente  $2,4553 \times 10^{-5}$  mol) (la pureza real de GLP-1 fue del 98,5% (por HPLC), y el contenido peptídico fue del 82,2%) en 90 ml de tampón carbonato sódico bicarbonato 20 mM a pH 10,0 seguido de la adición de 90,7 mg de mPEG-SPA 2K ( $3,6829 \times 10^{-5}$  mol) con agitación. La solución se dejó en agitación durante diez minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se acidificó a pH 4,30 por HAc 2 N para dar un volumen final de 100 ml. La solución se diluyó hasta 200 ml mediante la adición de agua desionizada, y la solución diluida tenía un pH de 4,30.

Esta forma monoPEGilada de GLP-1 formada de este modo, denominada "mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1", se purificó por cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic. La columna era una columna Vantage L Laboratory Column VL (Millipore) rellena con un medio de intercambio iónico de alto rendimiento de SP Sepharose (Amersham Biosciences). El caudal era de 14 ml/min. La fase móvil usada para la purificación fue tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,30 (solución A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (solución B). La solución a purificar se cargó en primer lugar sobre la columna. Después, el producto cargado se eluyó usando un gradiente de fase móvil. Se usó el siguiente reactivo: para volúmenes de retención de 0 ml a 550 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 550 ml a 1041 ml, 0% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1041 ml a 1093 ml, 10% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1093 ml a 1338 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1338 ml a 1486 ml, 100% de la fase móvil que contenía la solución B; para volúmenes de retención de 1486 ml y superior, 0% de la fase móvil que contenía la solución B. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción que correspondía al pico de mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado a un volumen de retención de 1098,2 ml se recogió (figura 11), se intercambiaba con tampón en agua desionizada y se liofilizó. Rendimiento: 23 mg.

El mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado purificado se analizó por SDS-PAGE (figura 12, Hilera 1). Su peso molecular se determinó por MALDI-TOF como 5499 Da.

El sitio de PEGilación del conjugado de mPEG<sub>2k</sub>-Lys-GLP-1 monoPEGilado en residuos de lisina (*Lys*<sup>26</sup> o *Lys*<sup>34</sup>) y no en el extremo *N* (*His*<sup>7</sup>) se confirmó por un análisis MALDI-TOF tras la digestión de la proteasa del conjugado usando Endoproteinasa LYS-C.

**Ejemplo 8****Estudio *In Vivo* en ratones para examinar los efectos reductores de la glucosa en sangre de los conjugados poliméricos de GLP-1 ilustrativos**

Se adquirieron ratones macho diabéticos (BKS.Cg-i-Lepr db/+Lepr db/01aHsd) en Harlan Laboratories, Ltd. (Jerusalén, Israel). Los animales de 8-9 semanas de edad (30-40 g) se colocaron en jaulas para ratones (dos animales por jaula), y se dejó que se aclimataran durante al menos 48 antes del inicio del estudio.

La preparación de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (Ejemplo 3), G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (Ejemplo 4), G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-Lys-GLP-1 (Ejemplo 5) y G2PEG2Fmoc<sub>40k</sub>-Lys-GLP-1 (Ejemplo 6), se ha descrito en los ejemplos anteriores. Cada compuesto se pesó con precisión en un vial de vidrio y se disolvió en solución salina normal para preparar una concentración que se acomodara a la dosis (en base a equivalentes de GLP-1) y el volumen de inyección de 100  $\mu$ l.

El estudio se dividió en dos fases: una fase de viabilidad y una fase de evaluación.

En la fase de viabilidad, en primer lugar se evaluó la viabilidad de usar ratones diabéticos db/db para probar la eficacia de GLP-1. En la realización de la fase de viabilidad, se usaron varios grupos de ratones en los que se usaron cuatro ratones en cada grupo. Se reunieron los datos de los niveles de glucosa iniciales para cada ratón durante 2-3 días antes de dosificar el fármaco. Esto se realizó para identificar cualquier valor atípico en el grupo de animales. El día del tratamiento (Día 0) cada animal se pesó. El día 0 se recogió una muestra de sangre (de 5 a 10  $\mu$ l) de la vena de la cola. El nivel de glucosa (mg/dl) se midió usando un analizador de glucosa. Después, cada animal se inyectó por vía subcutánea (SC) bajo la piel de la espalda. La cantidad del artículo de ensayo y la dosis (60 y 120  $\mu$ g/ratón) administrada se basó en el peso corporal medio del animal, y el volumen total de la dosis no excedió en 10 ml/kg. Después, se dejó que los animales volvieran a sus cajas. Las muestras de sangre de 5 a 10  $\mu$ l (<0,5% de 2 ml del volumen sanguíneo para un ratón de 35 g) se retiraron a través de un pinchazo con aguja/tubo capilar en los siguientes momentos: -3, -2, -1, 0, 0,04, 0,16, 0,33, 1,0, 1,16 días. Cada muestra de sangre recogida se ensayó para comprobar su nivel de glucosa. Al final del estudio, los animales se eutanasiaron mediante asfixia

con dióxido de carbono.

En la fase de evaluación, los resultados de la fase de viabilidad se usaron para seleccionar las dosis apropiadas necesarias para conseguir una administración sostenida de GLP-1 para un efecto de 3-5 días. Al realizar la fase de evaluación, se usaron ocho ratones en cada grupo. Se reunieron los datos de los niveles de glucosa iniciales para cada ratón durante 2-3 días antes de dosificar el fármaco. Esto se realizó para identificar cualquier valor atípico en el grupo de animales. El día del tratamiento (Día 0) cada animal se pesó. El día 0 se recogió una muestra de sangre (de 5 a 10  $\mu$ l) de la vena de la cola. El nivel de glucosa (mg/dl) se midió usando un analizador de glucosa. Después, cada animal se inyectó por vía subcutánea (SC) bajo la piel de la espalda. La cantidad del artículo de ensayo y la dosis administrada se basó en el peso corporal medio del animal, y el volumen total de la dosis no excedió en 10 ml/kg. Después, se dejó que los animales volvieran a sus cajas. Las muestras de sangre de 5 a 10  $\mu$ l (<0,5% de 2 ml del volumen sanguíneo para un ratón de 35 g) se retiraron a través de un pinchazo con aguja/tubo capilar en los siguientes momentos: -3, -2, -1, 0, 0,04, 0,16, 0,33, 1,0, 1,16 días. Cada muestra de sangre recogida se ensayó para comprobar su nivel de glucosa. Se retiró la comida a los animales durante las primeras cuatro horas después de la dosificación. Al final del estudio, los animales se eutanasiaron mediante asfixia con dióxido de carbono.

Tabla 4  
Compuestos de Ensayo y Dosis para Cada Grupo de Animales

Tratamiento	Lote o nº de referencia	Número de ratones por grupo	Dosis (en $\mu$ g)
Control negativo (solución salina)	Baxter, lote C645028	8	-
Control positivo 2 (GLP-1)	American Peptide, lote T05128191	8	60, 120
G2PEG2Fmoc <sub>20K</sub> -Lys <sub>(26 o 34)</sub> -GLP1	ZH 071805	8	420
G2PEG2Fmoc <sub>40K</sub> -Lys <sub>(26 o 34)</sub> -GLP1	ZH 072305	8	420
G2PEG2Fmoc <sub>20K</sub> -N <sup>ter</sup> -GLP1	ZH 082405	8	420
	ZH 092105		
G2PEG2Fmoc <sub>40K</sub> -N <sup>ter</sup> -GLP1	ZH 082505	8	420
	CP2F1		
	ZH 082505		
	CP2F2		

Los datos del estudio se recogieron y se analizaron. Se apreció que los animales toleraron las dosis subcutáneas individuales. Como se ilustra en la figura 13, se confirman los efectos reductores de la glucosa en sangre de GLP-1 y cada uno de los conjugados de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-Lys-GLP-1 (denominado "PEG20-Lys-GLP" en la figura) y G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-Lys-GLP-1 (denominado "PEG40-Lys-GLP1" en la figura). Puede observarse a partir de las mediciones farmacodinámicas (MF) que el GLP-1 se aclara rápidamente del ratón, pero que los conjugados de GLP-1 liberan el péptido durante un periodo de 3 a 4 días. Es decir, los conjugados degradables de GLP-1 ejemplares de la invención funcionan a modo de bomba molecular, liberando el GLP-1 intacto con el tiempo mediante hidrólisis *in vivo*. El polímero hidrófilo unido covalentemente (es decir, PEG) funciona no sólo para estabilizar el GLP-1 *in vivo* (es decir, protegiendo la proteína de la degradación enzimática), sino también para prolongar su semivida circulante liberando lentamente la proteína en el torrente sanguíneo durante un periodo prolongado de 3 a 4 días. También se observó que el conjugado de PEG de 40 kilodaltons tenía un efecto en las MF pequeño pero prolongado en comparación con 20 kilodalton del conjugado de PEG.

Los datos de la figura 13 sugieren que: (a) GLP-1 se libera en la sangre del ratón desde el sitio de inyección por difusión y por hidrólisis del conjugado PEGilado; y (b) la actividad reductora de la glucosa en sangre del PEG-GLP1 conjugado con lisina puede deberse a la combinación de la actividad de los conjugados intactos y la liberación *in vivo* aparente del péptido de los conjugados objeto.

La figura 14 ilustra el efecto reductor de la glucosa en sangre de GLP-1 y G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y G2PEG2Fmoc<sub>40K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1. Es evidente a partir de las mediciones farmacodinámicas (MF) que GLP-1 se aclara rápidamente del ratón, pero los conjugados PEG de GLP-1 liberan el péptido durante un periodo de 3 a 4 días. También se observa que el conjugado de PEG de PEG 40 kilodaltons tenía un efecto en las MF pequeño pero prolongado en comparación con el conjugado de PEG de 20 kilodaltons.

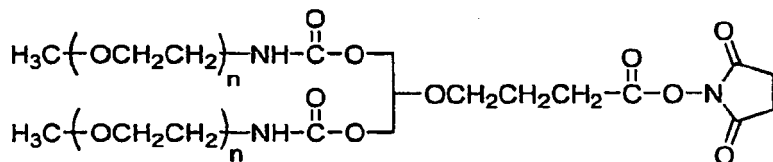
Este conjunto de datos (figura 14) sugiere que: (a) GLP-1 se libera en la sangre del ratón desde el sitio de inyección por difusión y por hidrólisis del conjugado PEGilado; y (b) el PEG-GLP1 conjugado con histidina no es activo, y la actividad reductora de la glucosa en sangre es el resultado de la liberación del péptido del conjugado.

Este estudio demuestra que una inyección del GLP-1 PEGilado que se describe en este documento puede usarse para controlar la diabetes durante un periodo de tiempo prolongado de más de 48 horas. Este estudio también demuestra la propiedad de la liberación sostenida de los reactivos de G2PEG2Fmoc al conjugarse con GLP-1. Este estudio también demuestra que GLP-1 puede estar PEGilado en el extremo N para proporcionar un producto

adecuado para la administración parenteral.

### Ejemplo 9

#### 5 PEGilación de GLP-1 con un derivado de mPEGN-hidroxisuccinimida ramificado, 40 kDa



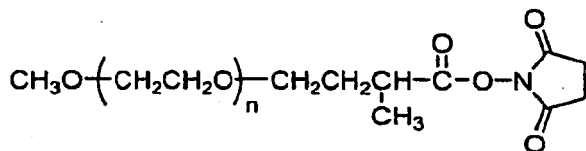
Derivado de mPEG-N-Hidroxisuccinimida Ramificado, 40 kDa, ("mPEG2-NHS")

10 Se calienta mPEG2-NHS, 40 kDa, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso de cinco veces (con respecto a la cantidad de GLP-1 en una alícuota medida de la solución madre de GLP-1) del mPEG2-NHS calentado en HCl 2 mM para formar una solución al 10% de reactivo. La solución al 10% de reactivo se añade rápidamente al alícuota de la solución madre de GLP-1 (1 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de la adición del reactivo de PEG, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta a 7,0. Para permitir el acoplamiento del mPEG2-NHS a GLP-1 a través de una unión amida, la solución de reacción se coloca en un Slow Speed Lab Rotator durante una noche para facilitar la conjugación a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe con tampón Tris. La solución de conjugado se caracteriza por SEC-HPLC para determinar los componentes de la mezcla de conjugados. Se usa cromatografía de intercambio iónico para purificar los conjugados.

Los conjugados de GLP-1 de pesos moleculares variables se preparan de forma análoga usando reactivos de mPEG2-NHS de diferentes pesos moleculares: 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 60 kDa, etc.

### 25 Ejemplo 10

#### PEGilación de GLP-1 con un derivado de $\alpha$ -metilbutanoato de mPEG-succinimidilo lineal, 30 kDa



30 Derivado de  $\alpha$ -Metilbutanoato de mPEG-Succinimidilo Lineal, 30 kDa ("mPEG-SMB")

35 Se calienta mPEG-SMB, 30 kDa, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso de diez veces (con respecto a la cantidad de GLP-1 en una alícuota medida de la solución madre de GLP-1) del mPEG-SMB calentado en HCl 2 mM para formar una solución al 10% de reactivo. La solución al 10% de reactivo se añade rápidamente a la alícuota de la solución madre de GLP-1 (1 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de la adición del mPEG-SMB, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta a 7,0. Para permitir el acoplamiento del mPEG-SMB al GLP-1 a través de una unión amida, la solución de reacción se coloca en un Slow Speed Lab Rotator durante una noche para facilitar la conjugación a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe con tampón Tris.

La solución del conjugado se caracteriza por SEC-HPLC. Se usa intercambio iónico para purificar los conjugados.

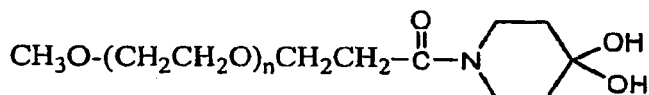
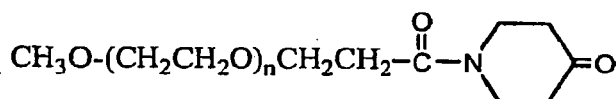
45 Usando este mismo procedimiento, se prepararon otros conjugados usando mPEG-SMB que tenían otros pesos moleculares medios en peso, por ejemplo, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 40 kD, etc.

### Ejemplo 11

#### 50 PEGilación de GLP-1 con mPEG-piperidona, 20 kDa

Se obtiene mPEG-Piperidona (mPEG-PIP) tenía un peso molecular de 20.000 Daltons en Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). A continuación, se proporciona la estructura básica del reactivo polimérico:





Derivado de mPEG-Piperidona Lineal, 20 kDa ("mPEG-PIP")

5 La estructura inferior corresponde a una forma hidratada.

Se calienta mPEG-PIP, 20 kDa, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso de cincuenta a cien veces (con respecto a la cantidad de GLP-1 en una alícuota medida en la solución madre de GLP-1) del mPEG-PIP calentado en fosfato sódico 10 mM (pH 7,0) para formar una solución al 10% de reactivo. La solución al 10% de reactivo se añade rápidamente a la alícuota de la solución madre de GLP-1 (1 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de la adición del mPEG-PIP, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta a 7,0, seguido de mezcla durante treinta minutos. Después, se añade un agente reductor, cianoborohidruro sódico, para preparar NaCNBH<sub>3</sub> 13 mM. La solución de reacción se coloca en un Slow Speed Lab Rotator durante una noche para facilitar la conjugación a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe con tampón Tris.

La solución del conjugado se caracteriza por SEC-HPLC. Se usa intercambio iónico para purificar los conjugados.

Usando este mismo procedimiento, pueden prepararse otros conjugados usando mPEG-PIP que tenga pesos moleculares medios en peso diferentes, por ejemplo, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 30 kD, 40 kD, etc.

### Ejemplo 12

#### PEGilación de GLP-1 con un derivado de mPEG-butiraldehído lineal, 20 kDa

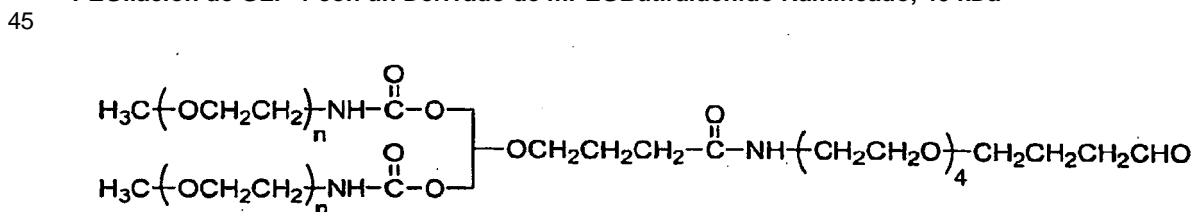
25  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$  Derivado de mPEG-Butiraldehído Lineal, 20 kDa ("mPEG-ButyrALD")

30 Se calienta el mPEG-ButyrALD, 20 kDa, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso de treinta veces (con respecto a la cantidad de GLP-1 en una alícuota medida en la solución madre de GLP-1) del mPEG-ButyrALD calentado en Milli-Q H<sub>2</sub>O para formar una solución al 10% de reactivo. La solución al 10% de reactivo se añade rápidamente a la alícuota de la solución madre de GLP-1 (1 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de la adición del mPEG-ButyrALD, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta a 6,0, seguido de mezcla durante treinta minutos. Después, se añade un agente reductor, cianoborohidruro sódico, para preparar NaCNBH<sub>3</sub> 9 mM. La solución de reacción se coloca en un Slow Speed Lab Rotator durante una noche para facilitar la conjugación a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe con tampón Tris. La solución del conjugado se caracteriza por SEC-HPLC y cromatografía de intercambio aniónico.

40 Usando este mismo procedimiento, pueden prepararse otros conjugados usando mPEG-ButyrALD que tenga peso moleculares medios en peso diferentes, por ejemplo, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 30 kD, 40 kD, etc.

### Ejemplo 13

#### PEGilación de GLP-1 con un Derivado de mPEGButiraldehído Ramificado, 40 kDa



Derivado de mPEG-Butiraldehído Ramificado, 40 kDa ("mPEG2-ButyrALD")

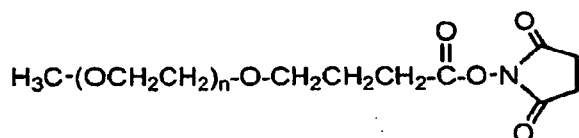
50 Se calienta mPEG2-ButyrALD, 40 kDa, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente.

- Se disuelve un exceso de treinta veces (con respecto a la cantidad de GLP-1 en una alícuota medida en la solución madre de GLP-1) del mPEG2-ButyrylALD calentado en Milli-Q H<sub>2</sub>O para formar una solución al 10% de reactivo. La solución al 10% de reactivo se añade rápidamente a la alícuota de la solución madre de GLP-1 (1 mg/ml en tampón fosfato sódico, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de la adición del mPEG2-ButyrylALD, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta a 6,0 usando técnicas convencionales seguido de mezcla durante treinta minutos. Después, se añade un agente reductor, cianoborohidruro sódico, para preparar NaCNBH<sub>3</sub> 9 mM. La solución de reacción se coloca en un Slow Speed Lab Rotator durante una noche para facilitar la conjugación a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe con tampón Tris.
- La solución del conjugado se caracteriza por SEC-HPLC y un procedimiento de cromatografía de intercambio iónico.
- Usando este mismo procedimiento, pueden prepararse otros conjugados usando mPEG2-ButyrylALD que tenga otros pesos moleculares medios en peso, por ejemplo, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 30 kD, 50 kD, 60 kD, etc.

#### 15 Ejemplo 14

##### PEGilación de GLP-1 con mPEG-SBA

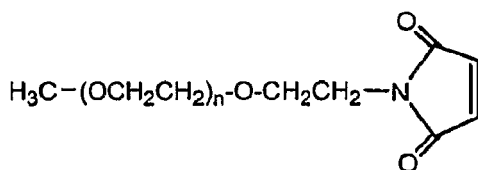
- Se obtiene butanoato de mPEG-succinimidilo que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons en Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). A continuación, se proporciona la estructura básica del reactivo polimérico:



- El GLP-1 se disuelve en una solución acuosa (1 mg/ml de solución tamponada con fosfato). Después, a esta solución se le añade un exceso molar de 1,5 a 10 veces de mPEG-SBA. Después de la adición del mPEG-SBA, el pH de la mezcla de reacción se determina y se ajusta de 7,0 a 7,5. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas.
- La mezcla de reacción se analiza por SDS-PAGE para determinar el grado de PEGilación de la proteína.

#### 30 Ejemplo 15

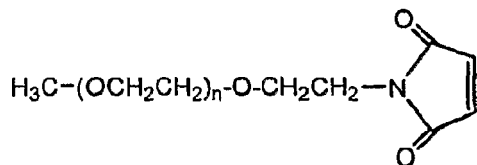
##### Conjugación del GLP-1 insertado en cisteína con mPEG-MAL, 20 K



mPEG MAL, 20 K

- El GLP-1 se inserta con uno o más residuos de cisteína de acuerdo con lo descrito en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° de Serie 60/346.474 y 60/405.097. Los compuestos de GLP-1 modificados con cisteína ilustrativos se describen en el documento WO 2004/093823.

- Se calienta mPEG-MAL, 20 K, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso molar de cinco a veinte veces del mPEG-MAL calentado, 20 K, en agua desionizada para preparar una solución al 10% de mPEG MAL. La solución de mPEG MAL se añade rápidamente a un alícuota de la solución madre de GLP-1 modificado con cisteína (1 mg/ml en HEPES 50 mM, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de una hora de reacción a temperatura ambiente, el vial de reacción se transfiere a la habitación fría y la reacción se deja continuar durante una noche a 4 °C en un mezclador rotatorio Rotomix (velocidad lenta, Thermolyne).
- La mezcla de conjugados se purifica usando cromatografía de filtración en gel. Se desarrolla un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se usa un análisis por SDS-PAGE para la caracterización de las muestras.

**Ejemplo 16****Conjugación de GLP-1 con mPEG-MAL, 30 K**

5

mPEG MAL, 30 K

El GLP-1 modificado con cisteína se obtiene como se ha descrito en el Ejemplo 16 anterior.

10

Se calienta mPEG-MAL, 30 K, almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. Se disuelve un exceso de cinco a veinte veces del mPEG-MAL calentado, 30 K, en agua desionizada para preparar una solución al 10% de mPEG MAL. La solución de mPEG MAL se añade rápidamente a una alícuota de solución madre de GLP-1 insertado en cisteína (1 mg/ml en HEPES 50 mM, pH 7,0) y se mezcla bien. Después de una hora de reacción a temperatura ambiente, el vial de reacción se transfiere a la habitación fría y la reacción se deja continua durante una noche a 4 °C en un mezclador giratorio Rotomix (velocidad lenta, Thermolyne).

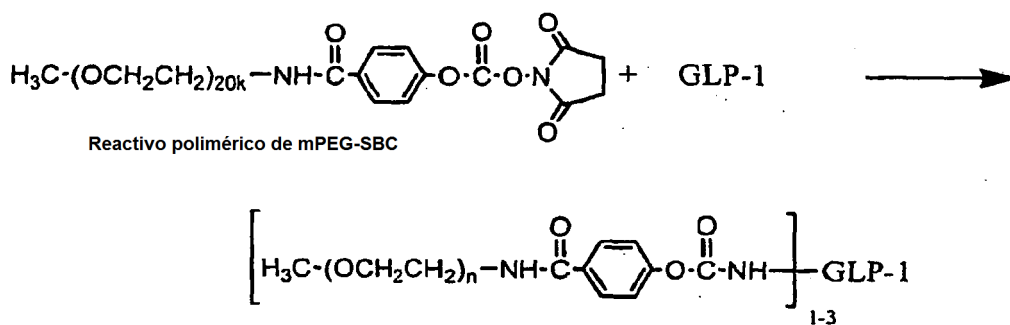
15

La mezcla de conjugados se purifica usando cromatografía de filtración en gel. Se desarrolla un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se usa un análisis por SDS-PAGE para la caracterización de las muestras.

20

**EJEMPLO 17****PEGilación de GLP-1 con benzamid-carbonato de mPEG-succinimidilo 20 kDa (mPEG-SBC 20 kDa) en una reacción acuosa**

25



30

Se calienta mPEG-SBC 20 kDa, disponible en Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama), almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. La reacción se realiza a temperatura ambiente. La cantidad calculada del mPEG-SBC calentado 20 kDa (414 mg, para obtener un exceso molar de 8 veces de mPEG-SBC 20 kDa en base al contenido absoluto de GLP-1) se pesa en un vial de vidrio de 5 ml. Se añade 1,1 ml de DMSO a PEG, y se calienta en un baño de agua a 40 °C hasta que se disuelve el PEG. Después, se deja equilibrarse de nuevo a temperatura ambiente. Se añade una alícuota de 2,0 ml de una solución de 4,5 mg/ml de GLP-1 preparada en solución salina tamponada con fosfato, PBS, pH 7,4) a un vial de vidrio de 10 ml y el volumen se lleva a 4,5 ml con más cantidad de PBS. La proteína se agita usando un agitador magnético a una velocidad moderada. El PEG se añade a la proteína mediante infusión de jeringa a una velocidad de aproximadamente 1 ml/min. La reacción se deja continuar durante 10 minutos. Después, se interrumpe disminuyendo el pH a 5,5 con HCl 1 M.

35

40

La solución de conjugados se analiza por SDS-PAGE y RP-HPLC.

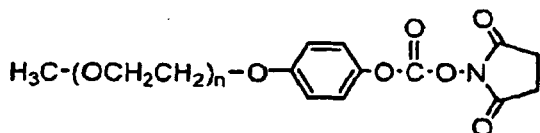
**EJEMPLO 18****PEGilación de GLP-1 con benzamid-carbonato de mPEG-succinimidilo 30 kDa (mPEG-SBC 30 kDa) en una reacción acuosa**

45

El GLP-1 se PEGila como se ha descrito en el Ejemplo 18 anterior con la excepción de que el reactivo de PEG empleado posee un peso molecular de 30 kDa.

#### EJEMPLO 19

5 **PEGilación de GLP-1 con fenil-carbonato de mPEG-succinimidilo 20 kDa (mPEG-SPC 20 kDa) en una reacción acuosa**



10 Reactivo polimérico de "SPC"

Se calienta mPEG-SPC 20 kDa, disponible en Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama), almacenado a -20 °C en una atmósfera de argón, a temperatura ambiente. La reacción se realiza a temperatura ambiente. Se usa un exceso molar absoluto de 8 veces del reactivo de mPEG-SPC, en base al contenido peptídico absoluto. El reactivo de PEG se pesa en un vial de vidrio de 5 ml que contiene una barra de agitación magnética. Se añade una alícuota de 2,0 ml de una solución de 4,5 mg/ml de GLP-1 preparada en solución salina tamponada con fosfato, PBS, pH 7,4 y el volumen se lleva a 4,5 ml con más cantidad de PBS. La mezcla se agita a velocidad máxima usando un agitador magnético hasta que el PEG se ha disuelto completamente. La velocidad de agitación se reduce al 50% y la reacción se deja continuar para que se produzca la formación del producto de los conjugados. El pH de la solución de conjugados al final de la reacción se mide y se acidifica adicionalmente mediante la adición de HCl 0,1 M, si es necesario, para llevar el pH de la solución final a aproximadamente 5,5.

Después, la solución de conjugados se analiza por SDS-PAGE y RP-HPLC (C18) para determinar el alcance de la reacción (es decir, si la reacción se ha completado).

Se realizan reacciones adicionales, realizadas como se ha descrito anteriormente, con (i) mPEG-SPC 30 kDa, y (ii) mPEG-SPC 40 kDa, disponible en Nektar Therapeutics, Huntsville, Alabama.

#### 30 Ejemplo 20

##### Ensayo de la actividad *in vitro* de conjugados PEG-GLP-1

La bioactividad de los conjugados que se han descrito en los Ejemplos 3-7 y 9-20 se ensaya usando un ensayo de actividad *in vitro* que se describe en Zlokarnik, y col. (1998), Science, 279: 84-88.

Las células HEK-293 que expresan el receptor de GLP-1 humano, usando el sistema PanVera LLC CRE-BLAM, se cultivaron a 20.000 a 40.000 células/pocillo/100  $\mu$ l de medio DMEM con PBS al 10% en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-d-lisina. El día después del cultivo, el medio se apartó y se añadieron 80  $\mu$ l de medio DMEM sin plasma. El tercer día después del cultivo, a cada pocillo se le añadieron 20  $\mu$ l de medio DMEM sin plasma con BSA al 0,5% que contenía diferentes concentraciones de conjugado de PEG-GLP-1 para generar una curva dosis-respuesta. Generalmente, se usaron catorce diluciones que contienen de 3 nanomolar a 30 nanomolar del conjugado de PEG-GLP-1 para generar una curva dosis-respuesta a partir de la cual pueden determinarse los valores CE<sub>50</sub>. Después de 5 horas de incubación, con el conjugado de PEG-GLP-1, se añadieron 20  $\mu$ l de un sustrato de  $\beta$ -lactamasa (CCF2/AM, Pan Vera LLC) y la incubación continuó durante una hora, momento en el que se determinó la fluorescencia en un fluorímetro.

#### Ejemplo 21

##### 50 Perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1

El perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se determinó.

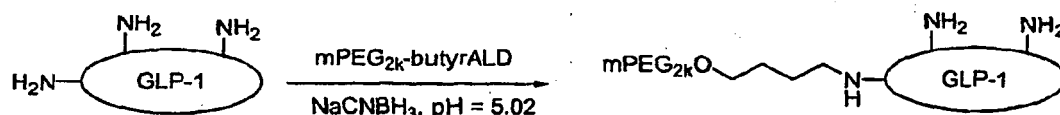
Se preparó G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (en forma de GLP-1 mono-PEGilado) como se describe en el Ejemplo 3 y se usó para evaluar la liberación de GLP-1 en condiciones de hidrólisis.

Las condiciones usadas para determinar el perfil de liberación *in vitro* de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 incluían: 2 mg/ml de G2PEG2Fmoc<sub>20K</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (forma de GLP-1 monoPEGilada) en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, 37 °C con muestras tomadas en diversos momentos y ensayadas para comprobar la presencia de GLP-1 "libre" o no conjugado. La liberación de GLP-1 se controló por HPLC de fase inversa a 215 nm.

La figura 15 expone los resultados del experimento en forma de gráfico, en el que  $Y = A_t/A_{m\acute{a}x}$ . ( $A_t$  es el área de pico por HPLC del GLP-1 liberado en el tiempo de  $t$  (h) y  $A_{m\acute{a}x}$  es el área de pico por HPLC del GLP-1 alcanzando su liberación máxima). Ya que la cinética de la reacción representa una reacción de primer orden debido a la linealidad de la representación, puede concluirse que  $\ln(1/Y) = kt$ , en el que  $kt$  es la inclinación,  $t_{1/2} = \ln 2/k$ . En base a la extrapolación de los datos, se determinó que el conjugado poseía una semivida de hidrólisis de 56,8 horas.

### Ejemplo 22

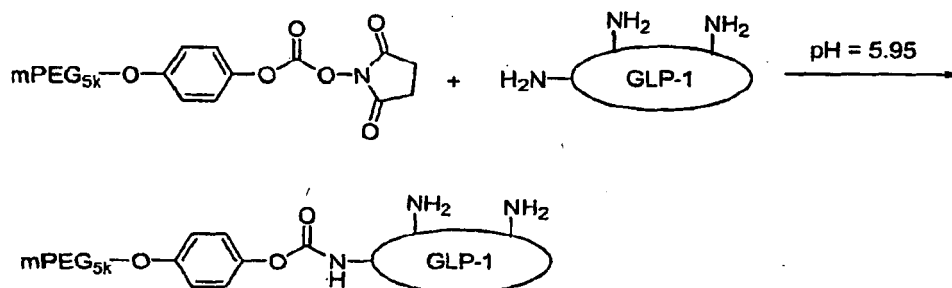
#### Síntesis y purificación de mPEG<sub>2k</sub>-O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1



Se disolvió GLP-1 (43,2 mg, 13,0  $\mu$ mol) en una solución de tampón acetato sódico (20 ml, pH = 5,02) y CH<sub>3</sub>CN (1000  $\mu$ l). Se añadió mPEG2k-butyrALD (259,2 mg, 130  $\mu$ mol) se añadió con agitación y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. Después, se añadió NaCNBH<sub>3</sub> (~5-8 mg, 7-10 equiv.) y la reacción de reducción se controló por HPLC analítica. Después de dejarlo reaccionar durante una noche (16 h), el producto se purificó por FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas) usando un Sistema AKTA™ Basic (Pharmacia) y un gradiente de CH<sub>3</sub>CN al 36,3-56% en TFA al 0,1% y Milli-Q agua en 0,76 VC (volumen de columna). Las fracciones que correspondían a mono mPEG2k-O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se recogieron. El producto se liofilizó y se obtuvo en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 64,5 mg.

### Ejemplo 23

#### Síntesis, purificación e hidrólisis de mPEG<sub>5k</sub>-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OCO-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (mPEG<sub>5k</sub>-SPC-N<sup>ter</sup>-GLP-1)

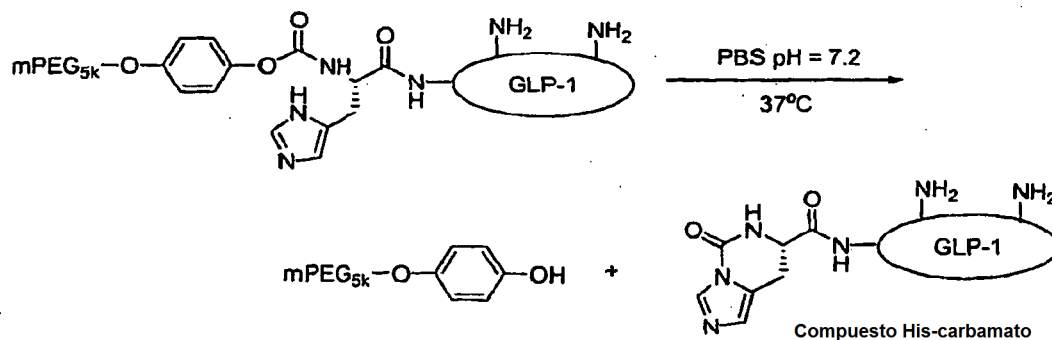


Se disolvió GLP-1 (43,6 mg, 13,2  $\mu$ mol) en una solución tamponada con acetato sódico (28 ml, pH = 5,95) a temperatura ambiente. Se añadió en varias porciones diferentes mPEG<sub>5k</sub>-SPC (556 mg, 111  $\mu$ mol) mientras que la evolución de la reacción se controló por HPLC analítica. Después de que se alcanzó el área de pico máximo del producto, la mezcla de producto se purificó inmediatamente usando un sistema AKTA™ Basic (Pharmacia) con un gradiente de CH<sub>3</sub>CN al 37,8-60% en TFA al 0,1% y Milli-Q agua en 5 VC. Las fracciones que correspondían a mono mPEG<sub>5k</sub>-SPC-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se recogieron (14 ml/fracción), y el producto se liofilizó y se obtuvo en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 75 mg.

#### Hidrólisis:

El mPEG<sub>5k</sub>-SPC-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se disolvió en tampón PBS (pH = 7,2) y se calentó a 37 °C. La hidrólisis se controló por HPLC analítica. Se determinó que la semivida era de aproximadamente 8 h de acuerdo con el detector de EM. El GLP-1 PEGilado se hidrolizó por completo después de 3 días, dejando un 6% de producto desconocido. Aunque el GLP-1 nativo se liberó tras la hidrólisis, el producto de hidrólisis principal no era GLP-1 libre, sino un compuesto His-carbamato que se muestra a continuación. Este resultado se confirmó adicionalmente por LC-MS.

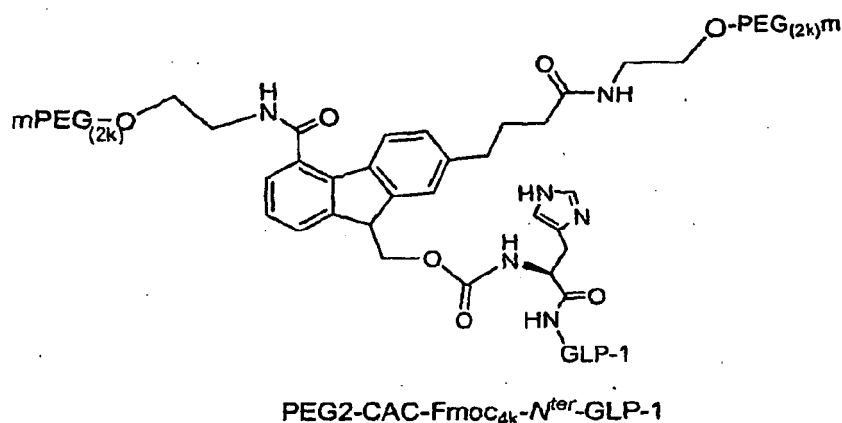
Se observó un fenómeno similar para el conjugado de GLP-1 N-terminal opuesto preparado por reacción con un reactivo de mPEG-SBC. Al intentar purificar adicionalmente el conjugado, en las condiciones utilizadas, se descubrió que el conjugado era extremadamente inestable. El conjugado hidrolizó rápidamente al GLP-1 nativo y un derivado de GLP-1 resultante de una reacción de cierre de anillo intramolecular debido a la reacción en el carbamato de carbonilo por el nitrógeno imidazolilo de la histidina N-terminal de GLP-1. El GLP-1 modificado liberado de esta manera se muestra a continuación. No se continuó con la purificación adicional.



**Ejemplo 24**

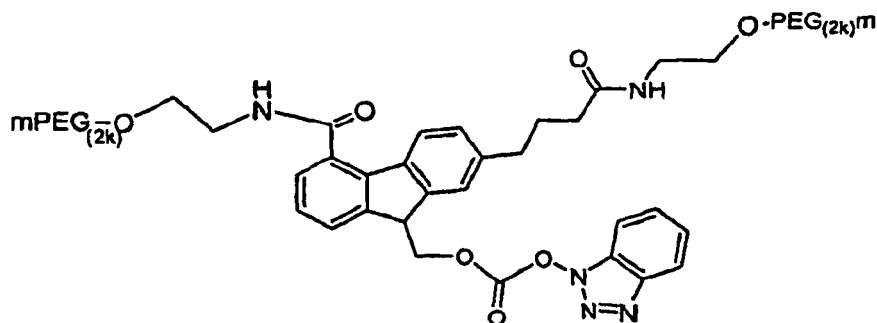
5 **Preparación de un Conjugado Polimérico de GLP-1 Ejemplar que tiene un Resto de PEG Liberable Unido a GLP-1:**

10 Preparación de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1



15 Un reactivo polimérico ilustrativo, PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-BTC (estructura proporcionada a continuación), se unió covalentemente al extremo N de GLP-1 para proporcionar una forma de profármaco de la proteína en la que el resto PEG está unido de forma liberable. La naturaleza de dos ramificaciones del reactivo polimérico proporciona un aumento de la estabilidad al resto GLP-1 posterior a la administración, para proporcionar de este modo una formulación de liberación sostenida, por lo que GLP-1 se libera a través de hidrólisis para proporcionar el precursor de GLP-1 nativo o no modificado. La estructura de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 se ha proporcionado anteriormente (en la estructura, "GLP-1" representa un residuo de GLP-1 que corresponde a los aminoácidos 8-36; la histidina N-terminal de GLP-1 se muestra explícitamente para ilustrar la conjugación en la alfa amina en lugar del anillo imidazol).

20

Carbonato de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-Benzotriazol

- 5 Se preparó PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-BTC (BTC = carbonato de benzotriazol) de acuerdo con los procedimientos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/454.971, presentada el 16 de junio de 2006, a la que la presente solicitud reivindica prioridad.

10 Se preparó una solución de 400 mg de GLP-1 ( $1,1146 \times 10^{-4}$  mol) en 100 ml de tampón acetato sódico 20 mM a pH 5,50 seguido de la adición lenta durante 5 minutos con agitación de 1,737 g de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-BTC ( $3,9013 \times 10^{-4}$  mol), que se acababa de disolver en 17 ml de HCl 2 mM. La solución se dejó en agitación durante 13 horas a temperatura ambiente, permitiendo de este modo la formación de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, un conjugado de GLP-1 PEGilado. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de 1 ml de glicina 1 M. El pH de la solución se ajustó a 7,0 por NaOH 0,5 N. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas más. Después, la mezcla de reacción inactivada se acidificó a pH 4,0 mediante la adición de HAc 20 mM. La reacción se controló por HPLC de fase inversa, usando una columna de 100 mm x 4,6 mm de DI Onyx monolithic C8 con mesoporos de 130 Å y macroporos de 2 µm, disponible en Phenomenex. Se empleó una fase móvil de TFA al 0,1% en agua desionizada (solución C) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (solución D) a 25 °C usando un gradiente lineal del 35% de B al 55% de B durante 4 minutos.

20 Para obtener el PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en forma monoPEGilada, la mezcla de reacción acidificada (125 ml) se dividió en 3 alícuotas, y cada alícuota se purificó individualmente por cromatografía de intercambio catiónico sobre un sistema AKTA Basic usando una fase móvil de tampón acetato sódico 20 mM a pH 4,30 (Solución A) y tampón acetato sódico 20 mM con NaCl 1 M a pH 4,30 (Solución B). La columna utilizada fue una columna Vantage L Laboratory Column VL (Millipore) rellena con 160 ml de volúmenes de columna de medio de columna de alto rendimiento con SP Sepharose (Amersham) con un caudal de 30 ml/min. La solución bruta se diluyó en primer lugar mediante la adición de tampón acetato sódico a pH 4,30, y después se cargó sobre la columna. La absorbancia UV del eluyente se controló a 215 nm. La fracción que correspondía al pico de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (forma monoPEGilada) se recogió. La purificación del producto en bruto restante se realizó, y las fracciones que correspondían al pico de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 (forma monoPEGilada) se combinaron, se analizaron por HPLC de fase inversa y se concentraron por ultrafiltración. La solución concentrada se intercambió con tampón en tampón citrato sódico 20 mM a pH 4,3. Después, la solución se liofilizó. Rendimiento: 163,2 mg.

35 El PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 purificado se analizó por SDS-PAGE. Su peso molecular se determinó por MALDI-TOF como 7831,6 Da. La naturaleza escindible del conjugado de G2PEG2Fmoc<sub>20k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 en medio acuoso [1:2 v/v de mezcla de tampón citrato sódico 20 mM a pH 4,30 con una solución 200 mM de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), incubada durante 16 horas a 37 °C] también se investigó mediante HPLC de fase inversa, a partir de lo cual se observó la liberación completa de GLP-1 del conjugado.

#### 40 Ejemplo 25

##### Evaluación farmacodinámica de un agonista de GLP-1 modificado, PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, en un modelo de ratón diabético

- 45 El objetivo del estudio era demostrar la actividad farmacológica de un conjugado de GLP-1 ilustrativo, PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, administrado por vía intratraqueal (IT) en el ratón.

50 Se usó un modelo de ratón macho diabético (BKS.Cg-i-Lepr db/+Lepr db/01aHsd) en el estudio. El sistema de ensayo incluyó 21 ratones macho diabéticos (BKS.Cg-+Lepr db/+Lepr db/01aHsd) de aproximadamente 8-9 semanas de edad (Harlan Labs). Véase la Tabla 5. Los ratones se anestesiaron y después se suspendieron en vertical por sus incisivos superiores. Aproximándose al animal suspendido desde la posición dorsal, se insertó por vía oral una jeringa de 1 ml equipada con una aguja sonda en el ratón y se descendió la traquea justo por debajo de la cara. La dosis se inyectó en los pulmones y después la aguja sonda se eliminó inmediatamente. Se administró

exenatida por inyección subcutánea (SC) usando una jeringa del calibre 20 G de 1 pulgada y 1 ml de tuberculina. Las muestras sanguíneas de aproximadamente 0,07 ml se recogieron de la vena de la cola en cada punto de tiempo. Estas muestras se ensayaron para observar las concentraciones de glucosa. La medición de la glucosa se hizo por duplicado con monitores de glucosa Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). El límite superior de la cuantificación (ULOQ) de estos glucómetros es 600 mg/dl. Este valor (600 mg/dl) se usó para el cálculo de las estadísticas descriptivas cuando se excedió el ULOQ. Las concentraciones de glucosa en sangre media del grupo, expresadas como % de la medida inicial, se proporcionan en la figura 16. Estos valores se calcularon para cada animal individual usando si medición de glucosa en sangre 24 horas previa a la dosis como medida inicial. La evaluación estadística se hizo con una prueba t de 2 colas a un valor P de 0,05 y la media del grupo comparada de los grupos de tratamiento y vehículo en los puntos de tiempo correspondientes. En ausencia de un punto de tiempo del vehículo correspondiente para la medición de la exenatida de la hora 1, se usó la medición del vehículo de la hora 4 por motivos de comparación estadística. Los puntos de tiempo seleccionados de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y los grupos tratados con exenatida también se compararon con sus valores T = 0 respectivos.

15 Tabla 5  
Diseño del estudio

Grupo nº	Artículo de control/ensayo	Vía de administración	Número de animales/sexo	Dosis total del artículo de ensayo (µg/ratón)	Nº de días de dosificación
1	PEG2-CAC-Fmoc <sub>4k</sub> -N <sup>ter</sup> -GLP-1	IT	12 M	1500	1
2	Vehículo	IT	6 M	NA	1
3	Exenatida	SC	3 M	0,1	1

20 Se consiguió el objetivo de este estudio, es decir, demostrar la actividad farmacológica de un conjugado de GLP-1 liberable ilustrativo, cuando se administró por vía intratraqueal (IT) en el ratón.

A los ratones se les administró PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 o un vehículo por vía intratraqueal y se ensayaron las concentraciones de glucosa en sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración. La exenatida administrada SC se usó como un control positivo.

25 Se observó una reducción significativa de la glucosa en sangre en el punto de tiempo de 1 hora en el grupo administrado de exenatida. La glucosa en sangre volvió a la medición inicial al siguiente punto de tiempo (8 h).

30 El PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 provocó una reducción sustancial en la glucosa en sangre a las 4 y 8 horas después de la administración. La magnitud de la supresión de glucosa fue mayor que la observada tras la administración de exenatida. Esta reducción fue estadísticamente significativa en comparación con la medición T = 0 hora previa a la dosis y con los valores para el grupo vehículo en el punto de tiempo correspondiente.

35 Se cree que el PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 intacto no tiene actividad farmacológica. Esto se debe presumiblemente a la interferencia del PEG N-terminal con la interacción del ligando de GLP-1 a su receptor. La observación de la actividad farmacológica *in vivo* y la aparición de la actividad máxima 8 horas después de la administración son coherentes con la escisión *in vivo* de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y la liberación del GLP-1 activo.

40 El otros 3 puntos de tiempo (31, 52 y 55 horas), se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y los grupos vehículo. La magnitud de la diferencia era considerablemente menor que la observada a las 4 y 8 horas. Por el contrario, las reducciones observadas a las 4 y 8 horas, los valores de glucosa en estos 3 puntos de tiempo no fueron significativamente diferentes de los valores en T = 0. El significado biológico de esta observación tendrá que evaluarse adicionalmente pero una escisión retardada del 4K-FMOC GLP-1 residual en el pulmón puede dar como resultado en teoría un retraso en la supresión de la glucosa.

45 No se observaron efectos adversos atribuidos al compuesto en estos estudios. La muerte de un ratón (animal 1-8) se atribuyó al procedimiento de administración.

50 En resumen, los resultados de este experimento indican que la administración intratraqueal de PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 dio como resultado una supresión estadísticamente significativa, profunda y prolongada de la glucosa en sangre en un modelo de ratón macho diabético (BKS.Cg-+Lepr db/+Lepr db/01aHsd).

### Ejemplo 26

55 **Evaluación farmacodinámica de un agonista de GLP-1 modificado, mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, en un modelo de ratón diabético**

El objetivo de este estudio es demostrar la actividad farmacológica del conjugado de GLP-1 liberable ejemplar, mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, cuando se administra por vía intratraqueal (IT) en el ratón.



Se usó un modelo de ratón macho diabético (BKS.Cg-i-Lepr db/+Lepr db/01aHsd) se usó en el estudio. El conjugado administrado, mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, puede escindir-se y se esperó que liberase GLP-1 activo *in vivo*. Se esperó que resto GLP-1 liberado tuviera una actividad reducida de aproximadamente 200 veces debido a un residuo carbonilo residual en el extremo N (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 23 anterior).

El sistema de ensayo incluyó 18 ratones macho diabéticos (BKS.Cg-+Lepr db/+Lepr db/01aHsd) de aproximadamente 8-9 semanas de edad (Harlan Labs). Véase la Tabla 5. Los ratones se anestesiaron y después se suspendieron en vertical por sus incisivos superiores. Aproximándose al animal suspendido desde la posición dorsal, se insertó por vía oral una jeringa de 1 ml equipada con una aguja sonda en el ratón y se descendió la traquea justo por debajo de la cara. La dosis se inoculó en los pulmones y después la aguja sonda de eliminó inmediatamente. Se administró exenatida por inyección subcutánea (SC) usando una jeringa del calibre 20 G de 1 pulgada y 1 ml de tuberculina. Las muestras sanguíneas de aproximadamente 0,07 ml se recogieron de la vena de la cola en cada punto de tiempo. Estas muestras se ensayaron para observar las concentraciones de glucosa. La medición de la glucosa se hizo por duplicado con monitores de glucosa Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). El límite superior de la cuantificación (ULOQ) de estos glucómetros es 600 mg/dl. Este valor (600 mg/dl) se usó para el cálculo de las estadísticas descriptivas cuando se excedió el ULOQ. Las concentraciones de glucosa en sangre media del grupo, expresadas como % de la medida inicial, se proporcionan en la figura 17. La evaluación estadística se hizo con una prueba t de 2 colas a un valor P de 0,05 y se compararon los puntos de tiempos con el valor T = 0 para este grupo de tratamiento.

Tabla 6  
Diseño del estudio

Grupo nº	Artículo de control/ensayo	Vía de administración	Número de animales/sexo	Dosis total del artículo de ensayo (µg/ratón)	Nº de días de dosificación
1	mPEGSPC <sub>5k</sub> -N <sup>ter</sup> -GLP-1	IT	9 M	1000	1
2	Vehículo	IT	6 M	NA	1
3	Exenatida	SC	3 M	0,1	1

Se consiguió el objetivo de este estudio, es decir, demostrar la actividad farmacológica del conjugado de GLP-1 PEGilado y liberable, mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1, cuando se administró por vía intratraqueal (IT) en el ratón.

A los ratones se les administró mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 o un vehículo por vía intratraqueal y se ensayaron para obtener las concentraciones de glucosa en sangre y de insulina en plasma en diversos puntos de tiempo después de la administración. La exenatida administrada SC se usó como un control positivo.

Se observó una reducción significativa de la glucosa en sangre en los puntos de tiempo de 1 y 3 horas en el grupo administrado con exenatida. La glucosa en sangre volvió a la medición inicial al siguiente punto de tiempo (24 h).

El mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 provocó una reducción sustancial en la glucosa en sangre del punto de tiempo de 2 horas al punto de tiempo de 31 horas (último) cuando se comparó con el vehículo (figura 17). Cuando las medias de los en los puntos de tiempo individuales se compararon con los valores previos a la dosis, la supresión de la glucosa a las 2 y 4 horas alcanzó un significado estadístico. Esto es cierto si los valores previos a la dosis de las -24 o las 0 horas se usan para la comparación. La reducción de la glucosa en estos puntos de tiempo no alcanzó significado cuando se comparó con los valores para el grupo vehículo en el punto de tiempo correspondiente. Ha de apreciarse que había sólo 3 ratones por punto de tiempo no previo a la dosis y que hay una variación considerable entre los valores de los ratones individuales.

Se asume que el mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 intacto no tiene actividad farmacológica. Esto se presume debido a la interferencia del PEG N-terminal con la interacción del ligando de GLP-1 a su receptor. Se espera que el resto GLP-1 liberado tenga un bajo nivel de actividad farmacológica cuando se compara con el GLP-1 nativo debido a un resto carbonilo residual en el extremo N (que probablemente también interferirá con la unión del ligando al receptor). Esta actividad intrínseca inferior del producto de escisión puede haber contribuido al efecto farmacológico menos pronunciado del mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 con relación al del PEG2-CAC-Fmoc<sub>4k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1. La observación de la actividad farmacológica *in vivo* y la aparición de la actividad máxima 4 horas después de la administración son coherentes con la escisión *in vivo* de mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 y la liberación de una forma del GLP-1 activo.

Aunque no alcanza un significado estadístico en puntos de tiempo individuales, la administración IT de mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-GLP-1 da como resultado una supresión evidente continuada después de los puntos de tiempo de 4 horas con respecto al grupo vehículo.

No se observaron efectos adversos atribuidos al compuesto en estos estudios.

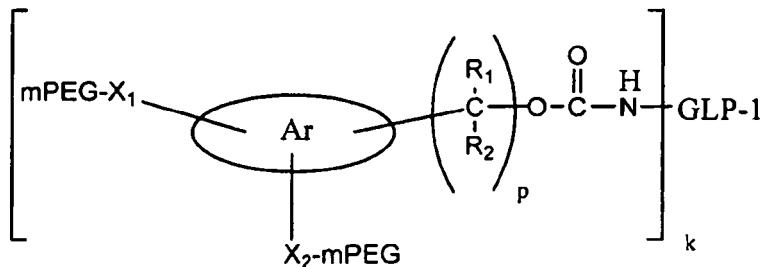
En resumen, los resultados de este experimento indican que la administración intratraqueal de mPEGSPC<sub>5k</sub>-N<sup>ter</sup>-

GLP-1, conjugado de GLP-1 escindible, dio como resultado una supresión estadísticamente significativa de la glucosa en sangre en un modelo de ratón macho diabético (BKS.Cg-+Lepr db/+Lepr db/01aHsd).

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado polimérico de GLP-1 que comprende un resto GLP-1 unido en su extremo N a un polímero no peptídico soluble en agua, que tiene la estructura:

5



en la que:

10 mPEG es  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,

n varía de 10 a 1800,

p es un número entero que varía de 1 a 8,

15

R<sub>1</sub> es H o un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sub>2</sub> es H o un grupo alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono,

20

Ar es un hidrocarburo aromático,

cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> es independientemente un resto separador que tiene una longitud de átomo de 1 a 18 átomos,

k es 1, 2 ó 3, y

25

-NH-GLP-1 es un resto GLP-1, en el que -NH- de -NH-GLP-1 representa un grupo amino del resto GLP-1.

2. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 1, en el que p es 1 y cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es H.

30

3. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 1 ó 2, en el que cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> comprende al menos un enlace amida.

4. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 3, en el que cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> es el mismo.

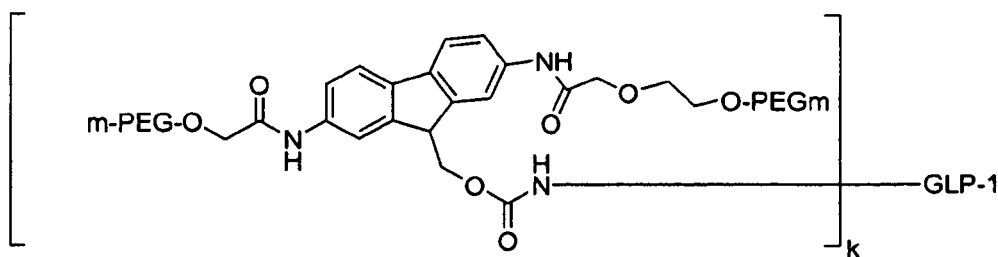
35

5. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 1, en el que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-, -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-O-, -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-C(O)-NH-, -NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>- y -C(O)-NH-, en el que q se selecciona entre 2, 3, 4 y 5.

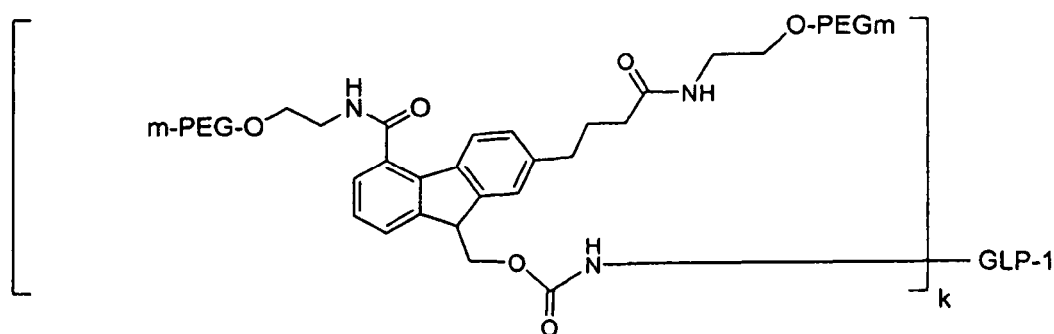
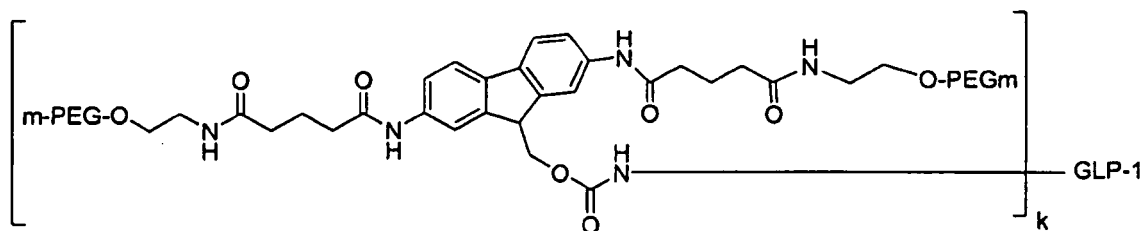
6. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 1, en el que el Ar se selecciona entre pentaleno, indeno, naftaleno, indaceno, acenaftileno y fluoreno.

40

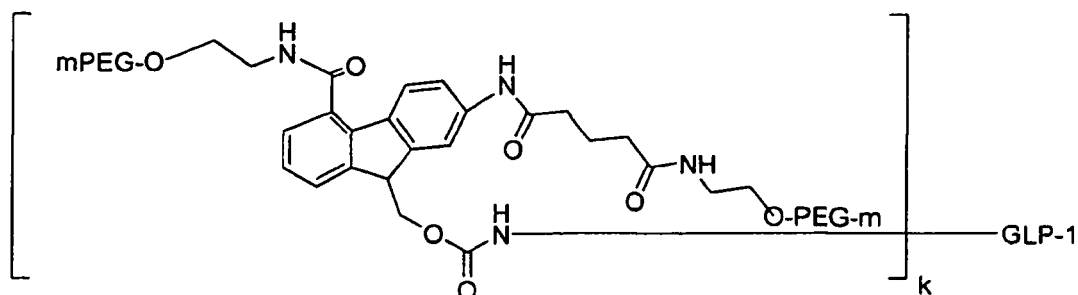
7. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada entre:



45



5 y



10 en las que -NH-GLP-1 es un resto GLP-1, en las que el -NH- de -NH-GLP-1 representa un grupo amino del resto GLP-1.

8. El conjugado polimérico de GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular que varía de 500 Daltons a 80.000 Daltons.

15 9. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 8, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular que varía de 1000 Daltons a 40.000 daltons.

20 10. El conjugado polimérico de GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polímero soluble en agua tiene una estructura seleccionada entre lineal, ramificada, bifurcada y multi-ramificada.

11. El conjugado polimérico de GLP-1 de la reivindicación 10, en el que el polímero soluble en agua es lineal o ramificado.

25 12. El conjugado polimérico de GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el resto GLP-1 está glicosilado.

13. El conjugado polimérico de GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el resto GLP-1 posee un sustituyente N-metilo en una cualquiera o más de las posiciones 7-His, 8-Ala y 9-Glu.

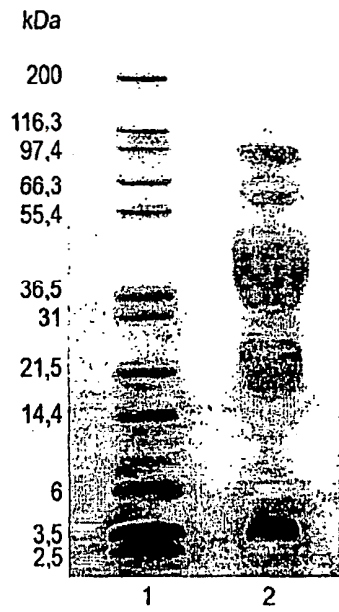


FIG. 1

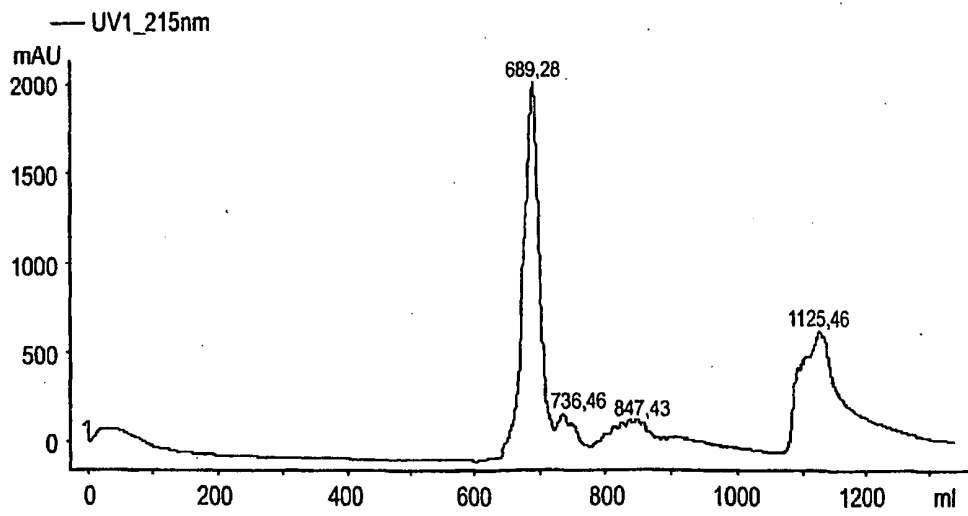


FIG. 2

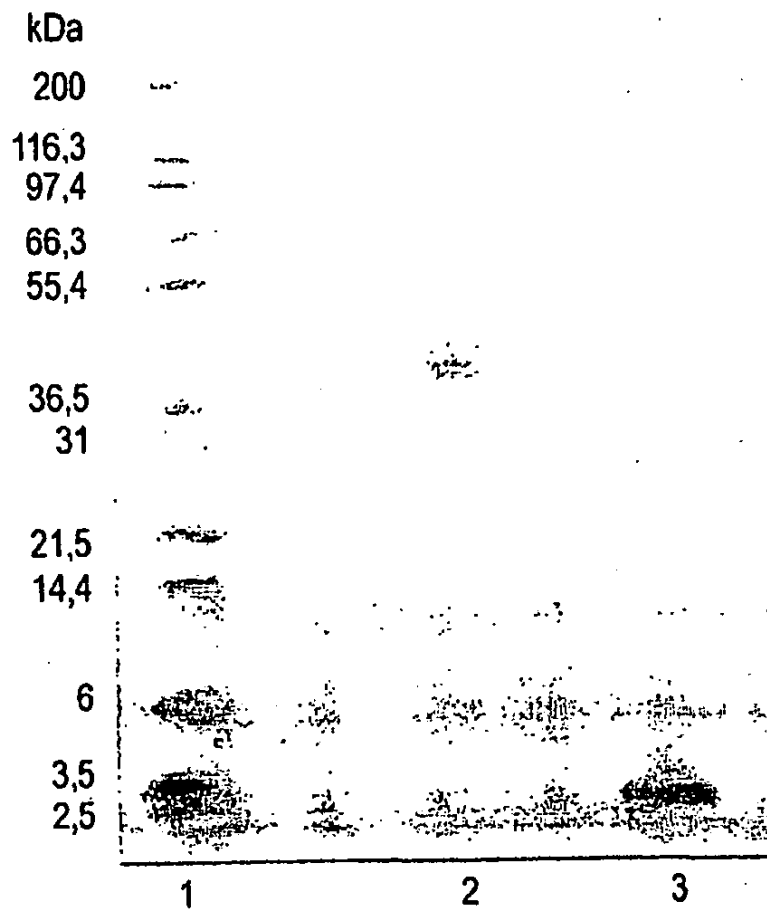


FIG. 3

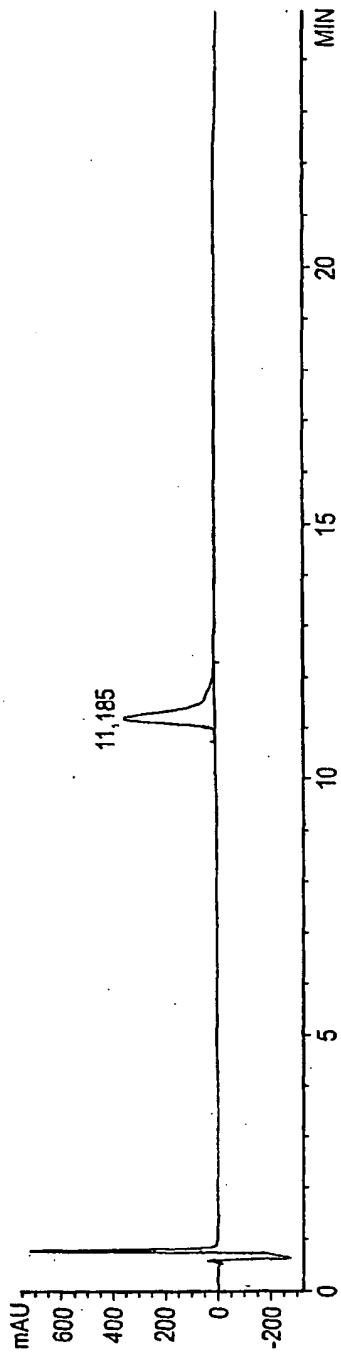


FIG. 4A

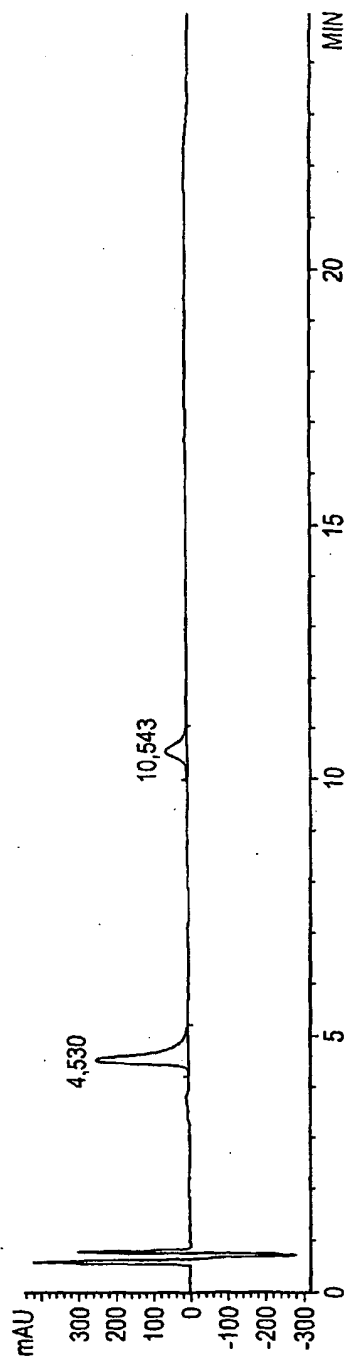


FIG. 4B

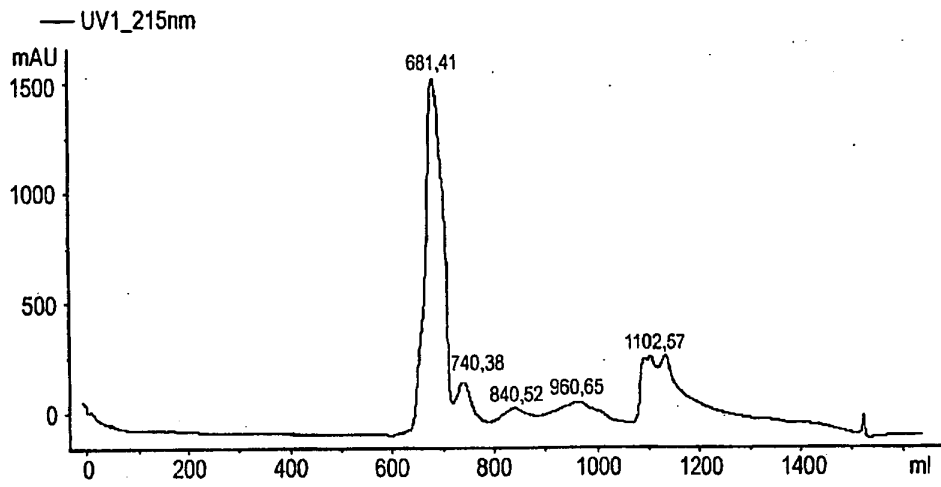


FIG. 5

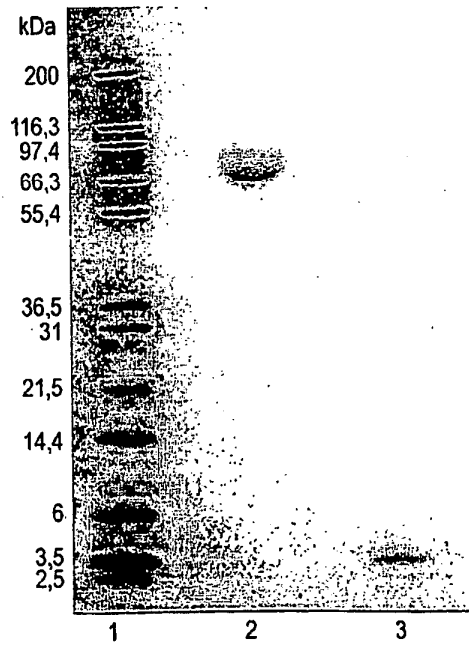


FIG. 6



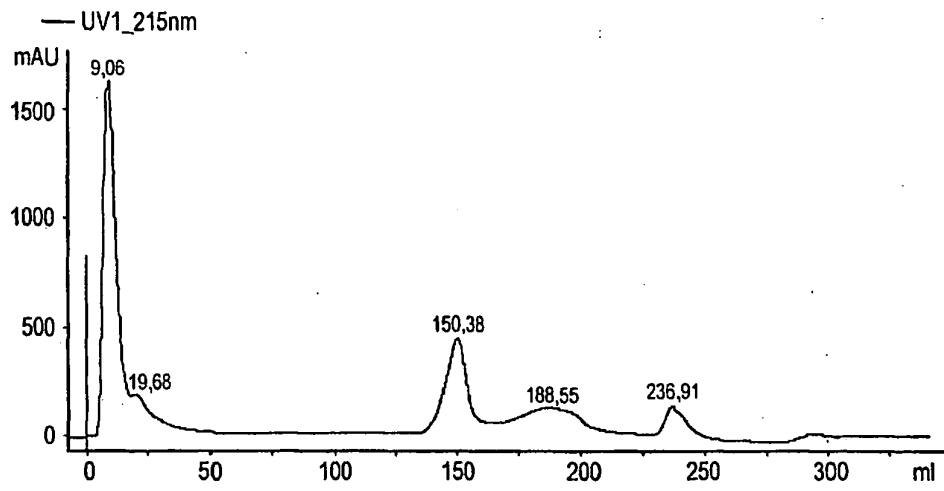


FIG. 7

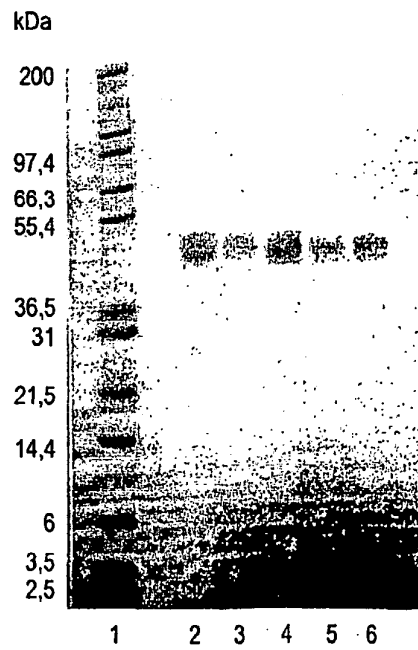


FIG. 8

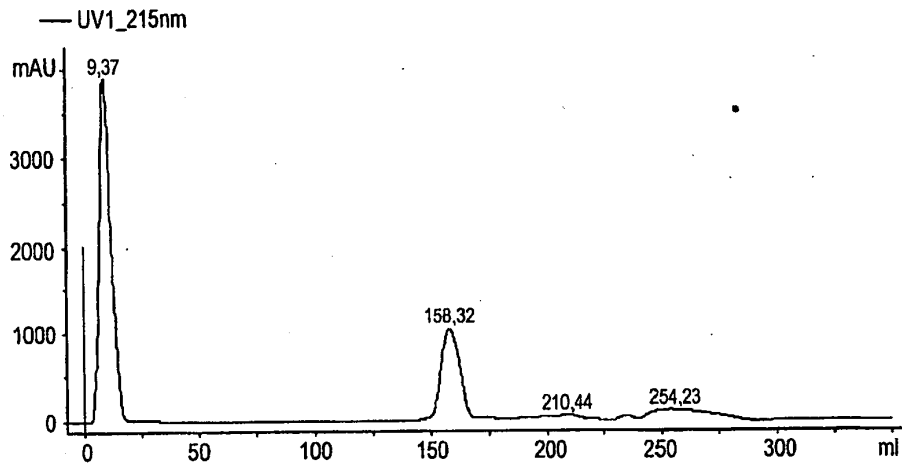


FIG. 9

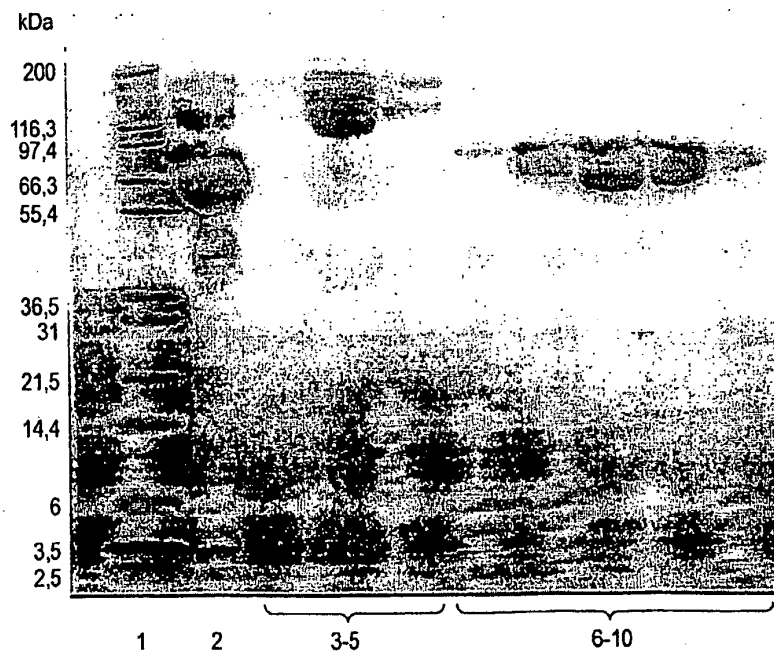


FIG. 10

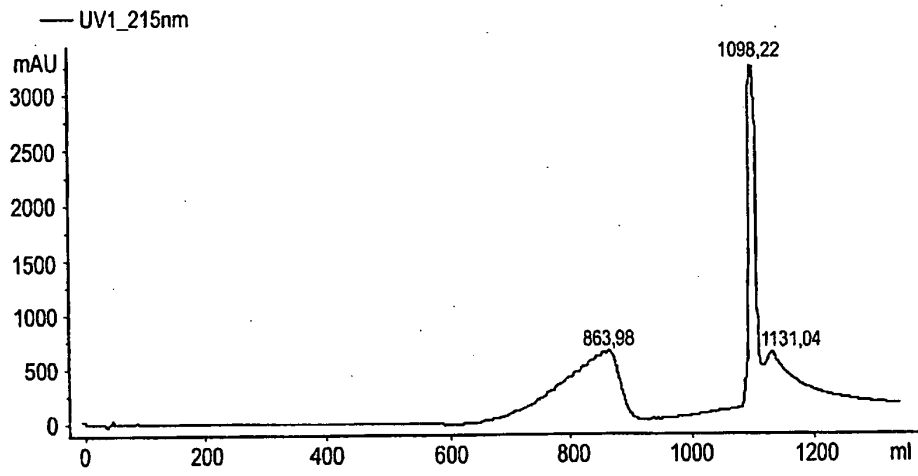


FIG. 11

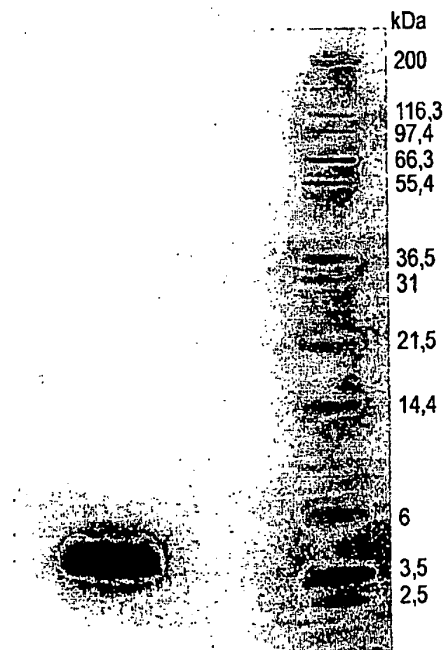
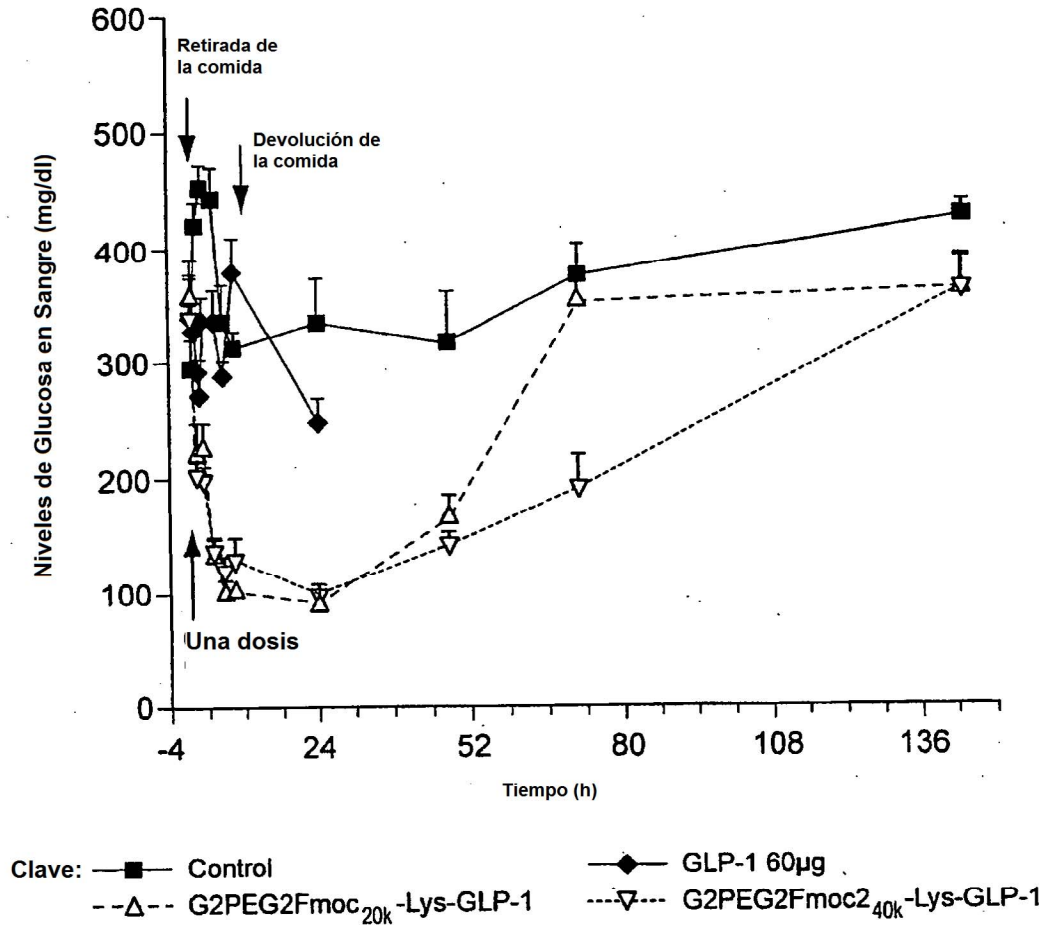
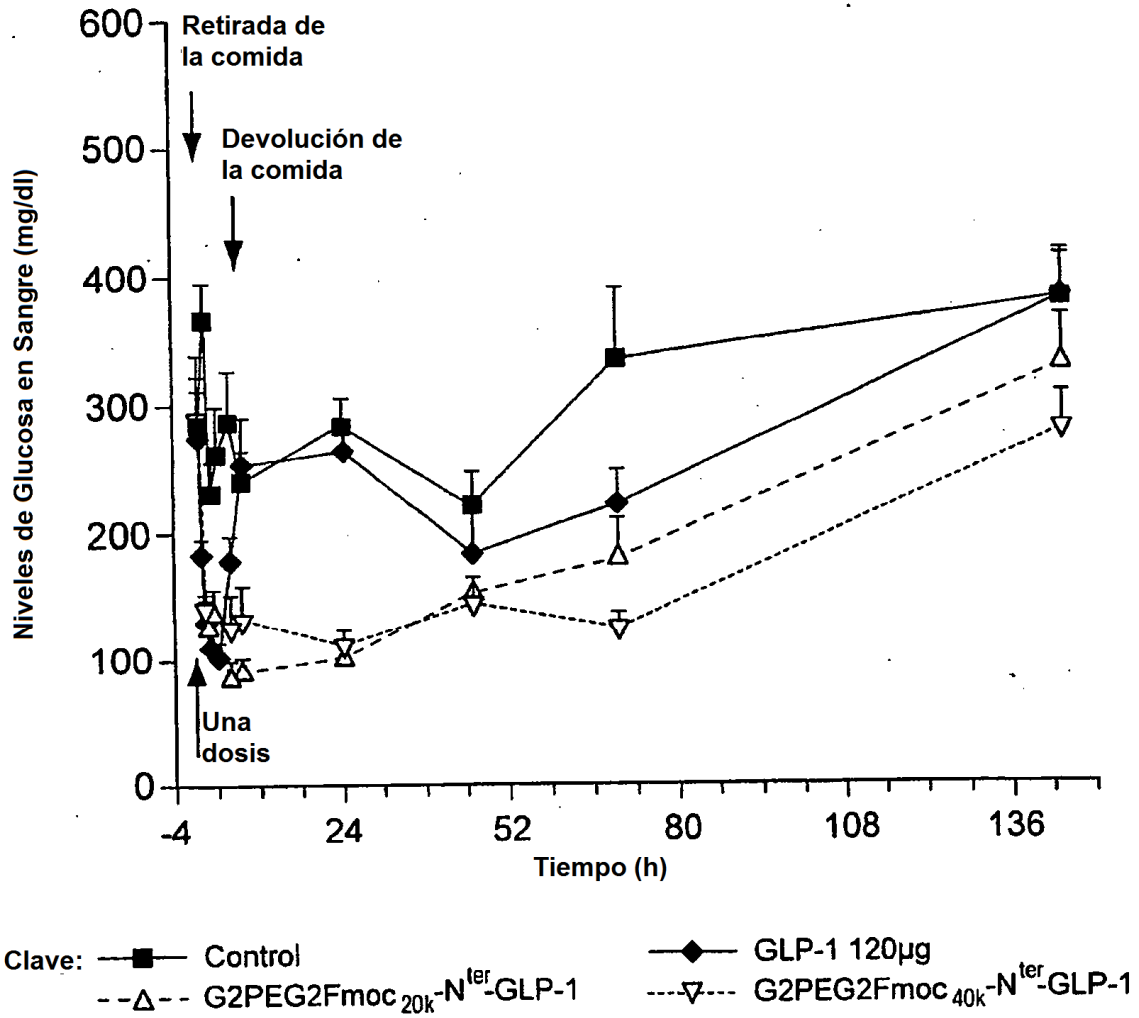


FIG. 12



\*ratones C57BL/KsOlaHsd-Lepr db

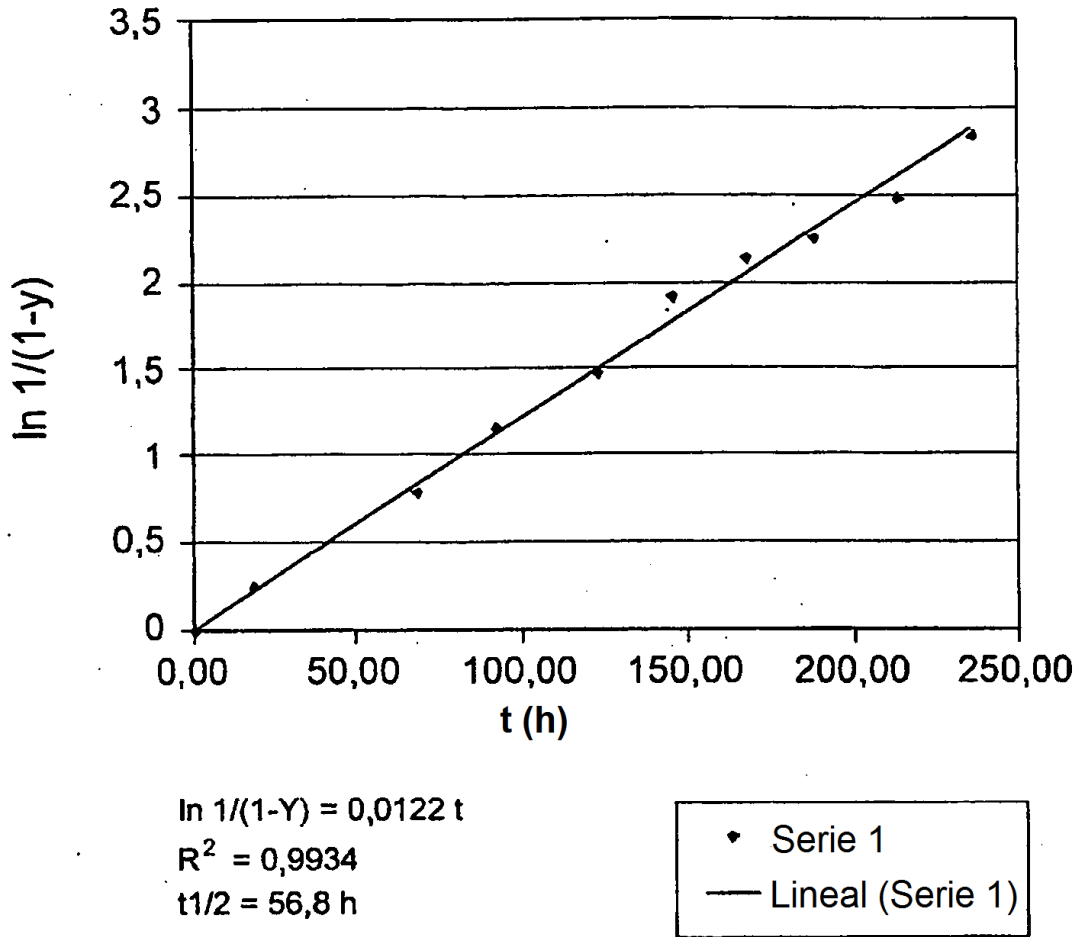
FIG. 13



\*ratones C57BL/KsOlaHsd-Lepr db

FIG. 14

**Cinética de Liberación de G2PEG2Fmoc20K-GLP-1**



**FIG. 15**

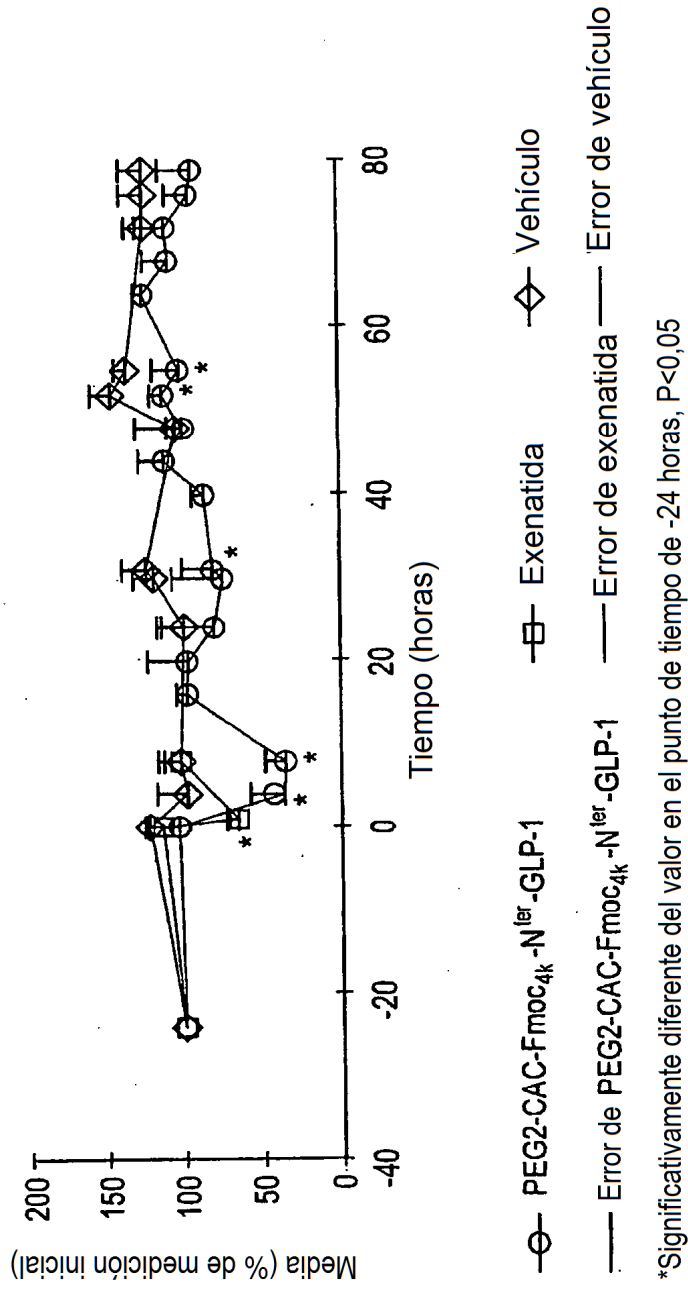
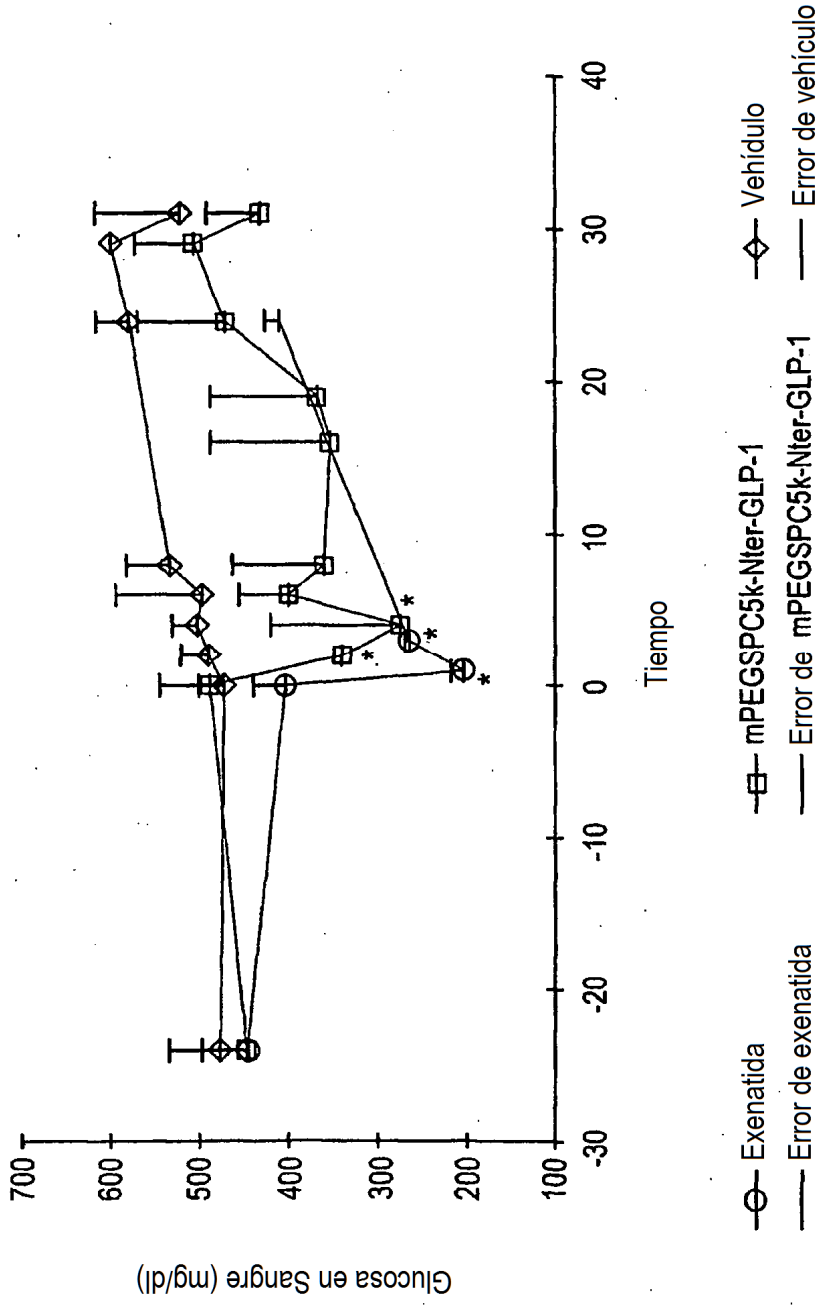


FIG. 16



\*Significativamente diferente del valor en el punto de tiempo a las -24 horas, P<0,05

FIG. 17