

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 241**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2005 E 08167128 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2033662**

54 Título: **Conjugación de péptidos mediante transglutaminasa**

30 Prioridad:

21.01.2004 DK 200400076

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

05.03.2013

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**NILS LANGELAND JOHANSEN, NIELS W.;
ZUNDEL, MAGALI y
DÖRWALD, FLORENCIO ZARAGOZA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 397 241 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

Conjugación de péptidos mediante transglutaminasa

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método nuevo para conjugación postraduccional de péptidos donde transglutaminasa se utiliza para incorporar un punto de fijación en el péptido al cual otro grupo puede ser selectivamente unido. Dichos péptidos conjugados han alterado características y pueden así ser usados en aplicaciones terapéuticas o pueden facilitar el análisis o aislamiento y purificación de dichos péptidos.

Antecedentes de la invención

[0002] Es bien conocido que modificar las propiedades y características de péptidos conjugando grupos al péptido cambia debidamente las propiedades del péptido. Tal conjugación requiere generalmente algún grupo funcional en el péptido para reaccionar con otro grupo funcional en un grupo de conjugación. Típicamente, grupos de amino, tal como el grupo de amino de N-terminal o el grupo de ϵ -amino en lisinas, han sido usados en combinación con un reactivo adecuado acilante. Es frecuentemente deseado o incluso requerido para ser capaz de controlar la reacción de conjugación, es decir para controlar dónde los compuestos de conjugación se fijan y para controlar cuántos grupos de conjugación son fijados. Esto frecuentemente se denomina especificidad.

[0003] Es un objeto de la presente invención proporcionar un método mediante el cual péptidos se puedan conjugar con un alto grado de especificidad. En términos generales, el método aprovecha una enzima, por ejemplo transglutaminasa, capaz de incorporar un compuesto que comprende un grupo adecuado funcional en el péptido, dónde dicho grupo funcional es posteriormente usado como un punto donde conjugar.

[0004] La conjugación de péptidos en general ha sido conocida por mucho tiempo, y US 4.179.337 describió hace más de 20 años péptidos conjugados con polietileno o polipropilenglicoles.

[0005] Diferentes tipos de químicas han sido descritas como eficaces en la formación de un enlace entre el péptido y la fracción a ser conjugada con el péptido. EP 605 963 divulga la injertación de polímeros acuosos que forman una conexión de oxima con un grupo de aldehído en una proteína. Ninguno de los aminoácidos naturales comprende un aldehído, así un grupo hidróxilo tiene que ser oxidado como un primer paso del proceso de conjugación. WO 96/41813 divulga polímeros que se funcionalizan con una oxima de amino-oxi formando grupo útil en las reacciones de conjugación. WO 98/05363 divulga un compuesto que comprende un péptido y un polímero hidrosoluble, donde los dos son de manera covalente conectados a través de un enlace de oxima al residuo de aminoácido N-terminal.

[0006] Derivados de hormona de crecimiento humana (hGH) de tamaño en aumento producido al reaccionar hGH con un éster de N-hidroxisuccinimida de polietileno glicol-5000 (PEG5000), un 5-kDa reactivo que selectivamente conjuga con aminas primarias, han sido descritos por Clarke et al.(JBC 271,21969 (1996)). WO 02/055532 describe hGH y variantes de hGH y una variedad de opciones para la conjugación de dicho polipéptido con una sustancia macromolar.

[0007] Además, el uso de enzimas para permitir una conjugación más específica de péptidos es conocido. EP 243 929 divulga el uso de enzimas proteolíticas, tal como carboxipeptidasa para incorporar un compuesto con un grupo funcional en el C-terminal de un péptido, dónde dicho grupo funcional puede posteriormente ser usado como un punto donde pegar grupos citotóxicos, otros péptidos o grupos indicadores usados para facilitar análisis del péptido, tal como por ejemplo grupos fluorescentes. Esta técnica, no obstante, limita el punto de fijación al residuo de aminoácido C-terminal, algo que constituye una limitación severa si el residuo C-terminal es esencial para la actividad del péptido.

[0008] Transglutaminasa ha sido usada previamente para alterar las propiedades de péptidos. En la industria alimentaria y en particular en la industria de diario muchas técnicas están disponibles para por ejemplo vincular péptidos usando transglutaminasas. Otros documentos revelan el uso de transglutaminasa para alterar las propiedades de péptidos fisiológicamente activos inclusive EP 950665 y EP 785276. Sato et al (Bioconjug.Chem 11, 502-509 (2000)) y Sato et al (Adv. Fármaco Del. Girar. 54, 487-504 (2002)) revelan la reacción directa entre un sustrato peptídico que comprende uno o dos sitios de sustrato TGase (incluyendo uno o dos Residuos de Gln) en una secuencia de péptidos fundida N-terminalmente a IL-2 y una PEG funcionalizada de amina o ligandos similares en presencia de transglutaminasa. Wada in Biotech. Lett., 23,1367-1372,2001 divulga la conjugación directa de β -lactoglobulina con ácidos grasos mediante transglutaminasa.

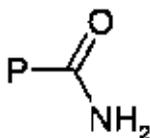
60 Resumen de la invención

[0009] Los presentes inventores han sorprendentemente encontrado que enzimas, tal como por ejemplo transglutaminasa, se pueden utilizar para incorporar en un péptido uno o más grupos funcionales, que no son accesibles en el péptido para formar un péptido funcionalizado, y que este péptido funcionalizado puede posteriormente ser reaccionado con otro compuesto que comprende una fracción de conjugación y uno o más grupos funcionales capaces de reacción con el grupo o grupos funcionales así incorporados en el péptido.

[0010] Tal método proporciona un alto grado de especificidad en que transglutaminasa puede sólo catalizar la incorporación de compuestos a residuos de aminoácidos que son sustratos para transglutaminasa, y en que los grupos funcionales se seleccionan de modo que ellos sólo reaccionan entre sí, no con otros grupos funcionales accesibles en el péptido. De esta manera, la fracción de conjugación sólo se une a localizaciones o lugares geométricos controlados, y por selección de los grupos funcionales, el número de grupos conjugados puede ser controlados.

[0011] Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para conjugar péptidos, dicho método incluye las siguientes etapas

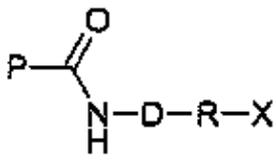
10 i) reaccionar en uno o más pasos un residuo de Gln con péptido representado por la fórmula



15 con un nitrógeno con nucleófilo (primer compuesto) representado por la fórmula



20 que comprende uno o más grupos funcionales o grupos latentes funcionales, que son no accesibles en cualquiera de los aminoácidos constituyendo dicho péptido, en presencia de transglutaminasa capaz de catalizar la incorporación de dicho primer compuesto en dicho péptido para formar un péptido transaminado de la fórmula

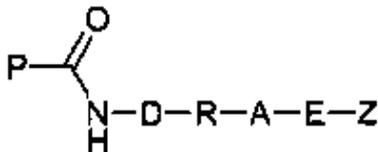


25 y
ii) opcionalmente activar dicho grupo latente funcional X, y

30 iii) reaccionar en uno o más pasos dicho péptido transaminado con un segundo compuesto de la fórmula



35 que comprende uno o más grupos funcionales, donde dicho grupo(s) funcional no reacciona con grupos funcionales accesibles en los residuos de aminoácidos constituyendo dicho péptido, y donde dicho grupo(s) funcional en dicho segundo compuesto es capaz de reacción con dicho grupo(s) funcional en dicho nitrógeno con nucleófilo (primer compuesto) de modo que un enlace covalente entre dicho péptido transaminado y dicho segundo compuesto es formado dando como resultado un péptido conjugado de la fórmula



40 donde D representa un enlace u oxígeno;

R representa un enlazador o un enlace;

X representa un radical que comprende un grupo funcional o un grupo latente funcional no accesible en los residuos de aminoácido que constituyen el péptido P-C(O)-NH₂;

45 Y representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales estos grupos reaccionan con grupos funcionales presentes en X, y estos grupos funcionales no reaccionan con grupos funcionales accesibles en el péptido P-C(O)-NH₂;

E representa un enlazador o un enlace;

A representa una oxima, hidrazono, fenilhidrazona, semicarbazona, triazol o fracción de isooxazolidina, la fracción formada por la reacción entre los grupos funcionales comprendida en X e Y; y

Z es la fracción a ser conjugada al péptido.

50 [0012] Péptidos conjugados por el método de la presente invención también se describen. Péptidos que son en cierto modo modificados para hacerlos más adecuados para el método de la presente invención son también mencionados

aquí.

[0013] Reactivos y enzimas adecuados para uso en los métodos de la presente invención son posteriormente descritos.

5 [0014] Composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos conjugados por métodos de la presente invención son también incluidos en la descripción.

[0015] Péptidos conjugados según los métodos de la presente invención para uso en la terapia son también descritos.

10 [0016] Métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que comprenden la administración de péptidos conjugados preparados según los métodos de la presente invención son también descritos.

[0017] Es también otro objetivo de la presente invención proporcionar un método para mejorar las propiedades farmacológicas de un péptido por conjugación de dicho péptido según los métodos de la presente invención.

15 Definiciones

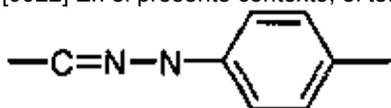
[0018] En el presente contexto "transaminación" o similar se destina a indicar una reacción dónde nitrógeno en la cadena lateral de glutamina se intercambia por nitrógeno de otro compuesto, en particular nitrógeno de otro nitrógeno con nucleófilo.

[0019] En el presente contexto, el término "no accesible" se destina a indicar que algo está ausente o ausente *de facto* en el sentido de que no se puede alcanzar. Cuando se declara que grupos funcionales no son accesibles en un péptido a ser conjugado se quiere indicar que dicho grupo funcional está ausente en el péptido o, si presente, de alguna forma evitado de tomar parte en reacciones. Por ejemplo, dicho grupo funcional podría ser aplastado en la estructura del péptido de modo que se resguarda de participar en la reacción, o éste podría estar localizado en un área del péptido dónde la flexibilidad restringida de la cadena peptídica impide que el grupo funcional participe en reacciones. Es reconocido que el hecho de que un grupo funcional sea accesible o no depende de las condiciones de reacción. Puede ser previsto que en presencia de agentes desnaturalizantes o a temperaturas elevadas el péptido pueda desplegarse para exponer grupos funcionales de otra manera no accesibles. Debe entenderse que "no accesible" significa "no accesible en la condición de reacción elegida para la reacción de interés en particular".

[0020] En el presente contexto, el término "enlace de oxima" se destina a indicar una fracción de la fórmula-C=N-O-.

35 [0021] En el presente contexto, el término "enlace de hidrazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula-C=N-N-.

[0022] En el presente contexto, el término "enlace de fenilhidrazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula



40 [0023] En el presente contexto, el término "enlace de semicarbazono" se destina a indicar una fracción de la fórmula-C=N-N-C(O)-N-.

[0024] El término "alcano" se destina a indicar un hidrocarburo saturado, lineal, ramificado y/o cíclico. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 1 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 1 a 20 (ambos incluidos), tal como de 1 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 1 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

50 [0025] El término "alqueno" se destina a indicar un hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico que comprende al menos un enlace doble de carbono-carbono. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 2 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

55 [0026] El término "alquino" se destina a indicar un hidrocarburo lineal, ramificado y/o cíclico que comprende al menos un enlace triple de carbono-carbono, y éste puede opcionalmente comprender uno o más enlaces dobles de carbono-carbono. A menos que sea especificado con otro número de átomos de carbono, el término se destina a indicar hidrocarburos con de 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), por ejemplo de 2 a 5 (ambos incluidos); o de 15 a 30 átomos de carbono (ambos incluidos).

60 [0027] El término "compuesto aromático homocíclico" se destina a indicar hidrocarburos aromáticos, tal como benceno y naftaleno.

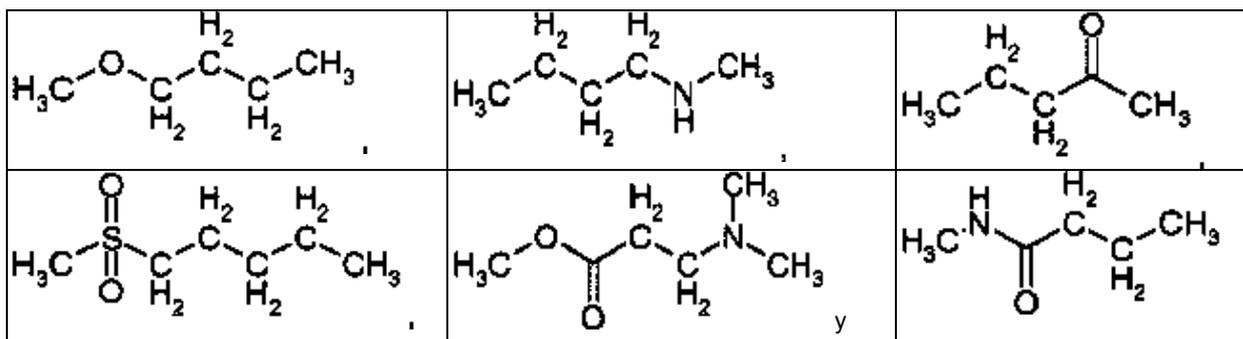
[0028] El término "compuesto heterocíclico" se destina a indicar un compuesto cíclico que comprende 5, 6 ó 7 átomos de anillo donde 1, 2, 3 o 4 son hetero átomos seleccionados de N, O y/o S. Ejemplos de compuestos heterocíclicos aromáticos incluyen tiofeno, furano, pirano pirrol, imidazol, pirazolo, isotiazol, isooxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, al igual que sus equivalentes parcialmente o completamente hidrogenados, tal como piperidina, pirazolidina, pirrolidina, pirolínea, imidazolidina, imidazolina, piperazina y morfolina.

5

[0029] Los términos, "hetero alcano" "hetero alquino" y "hetero alqueno" se destinan a indicar alcanos, alquenos y alquinos tal como se ha definido anteriormente, en el que uno o más heteroátomo o grupo ha sido insertado en la estructura de dichas fracciones.

10

Ejemplos de hetero grupos y átomos incluyen-O-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)-C(S)-y-N(R*)-, donde R* representa hidrógeno o C₁-C₆-alquilo. Ejemplos de heteroalcanos incluyen.



15

[0030] El término "radical" o "biradical" se destina a indicar un compuesto donde uno o dos, respectivamente, átomos de hidrógeno han sido quitados. Cuando específicamente declarado, un radical puede también indicar la fracción formada por la eliminación formal de un grupo más grande de átomos, por ejemplo hidróxilo, de un compuesto.

20

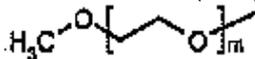
[0031] El término "halógeno" se destina a indicar elementos del grupo séptimo principal de la tabla periódica, por ejemplo F, Cl, Br e I.

25

[0032] El término "PEG" se destina a indicar polietilenglicol de un peso molecular entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000.000 Da, sus análogos incluidos, donde por ejemplo el grupo OH terminal ha sido sustituido por un grupo alcoxi, tal como por ejemplo un grupo de metoxi, un grupo etoxi o un grupo de propoxi. En particular, el PEG donde el grupo terminal-OH ha sido sustituido por metoxi se denomina mPEG.

30

[0033] El término "mPEG" (o mejor dicho "mPEGil") significa un radical polidisperso o monodisperso de la estructura



35

donde m es un número entero mayor que 1. Así, un mPEG donde m es 90 tiene un peso molecular de 3991 Da, es decir aprox 4kDa. Asimismo, un mPEG con un peso medio molecular de 20 kDa tiene una m media de 454. Debido al proceso para producir mPEG estas moléculas frecuentemente tienen una distribución de pesos moleculares. Esta distribución es descrita por el índice de polidispersidad.

40

[0034] El término "índice de polidispersidad" como se utiliza en este caso significa la proporción entre el peso molecular del promedio en peso y el peso molecular del promedio en número, como conocido en la técnica de química polimérica (ver por ejemplo "Polymer Synthesis and Characterization", J.A. Nairn, University of Uta, 2003). El índice de polidispersidad es un número que es mayor de o igual a uno, y se puede estimar de datos de Gel Permeation Chromatographic. Cuando el índice de polidispersidad es 1, el producto es monodisperso y está así compuesto por compuestos con un único peso molecular. Cuando el índice de polidispersidad es mayor de 1 esta es una medida de la polidispersidad de ese polímero, es decir cómo de ancha es la distribución de polímeros con pesos diferentes moleculares.

45

[0035] El uso de, por ejemplo, "mPEG20000" en fórmulas, nombres de compuesto o en estructuras moleculares indica un residuo de mPEG donde mPEG es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

50

[0036] El índice de polidispersidad típicamente aumenta con el peso molecular de PEG o mPEG. Cuando se hace referencia es a 20 kDa PEG y en particular 20 kDa mPEG se destina a indicar un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad por debajo de 1,06, tal como por debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como por debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03. Cuando la referencia es hecha a 30 kDa PEG y en particular 30 kDa mPEG ésta se destina a indicar un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad debajo de 1,06, tal como debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03. Cuando la referencia es hecha a 40 kDa PEG y en particular 40 kDa mPEG ésta se destina a indicar

un compuesto (o de hecho una mezcla de compuestos) con un índice de polidispersidad debajo de 1,06, tal como debajo de 1,05, tal como debajo de 1,04, tal como debajo de 1,03, tal como entre 1,02 y 1,03.

5 [0037] En el presente contexto, las palabras "proteína" y "péptido" son usadas de forma intercambiable y se destinan a indicar los mismo. El término "péptido" se destina a indicar un compuesto con dos o más residuos de aminoácidos enlazados por un enlace peptídico. Los aminoácidos pueden ser naturales o innaturales. El término es también destinado a incluir dichos compuestos sustituidos con otros péptidos, sacáridos, lípidos u otro mineral orgánico, al igual que compuestos donde uno o más residuos de aminoácidos han sido químicamente modificados. El término es también destinado a incluir péptidos a los que grupos protésicos son fijados. En particular, el péptido ejercita una actividad fisiológica, tal como por ejemplo terapéutica.

15 [0038] En el presente contexto, el término "arilo" se destina a indicar un radical de anillo aromático homocíclico o un radical de sistema anular fundido homocíclico donde al menos uno de los anillos son aromáticos. Grupos de arilo típicos incluyen fenilo, bifenililo, naftilo, tetralinil y similares.

20 [0039] El término "heteroarilo", como se utiliza en este caso, solo o en combinación, se refiere a un radical de anillo aromático con por ejemplo de 5 a 7 átomos de anillo, o a un radical de sistema de anillo aromático fundido con por ejemplo de 7 a 18 átomos de anillo, donde al menos un anillo es aromático y contiene uno o más heteroátomos como átomos de anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno o heteroátomos de azufre, donde n-óxidos y monóxidos de azufre y dióxidos de azufre son permisibles sustituciones heteroaromáticas. Ejemplos incluyen furanilo, tienilo, tiofenilo, pirrolil, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolil, oxadiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piridazinil, pirazinilo, pirimidinil, quinoleínilo, isoquinoleínilo, benzofuranilo, benzotiofenil indolil, indazolilo, y similares.

25 [0040] El término "conjuguar" como sustantivo se destina a indicar un péptido modificado, es decir un péptido con una fracción conectada a éste para modificar las propiedades de dicho péptido. Como verbo, el término se destina a indicar el proceso de unión de una fracción a un péptido para modificar las propiedades de dicho péptido.

30 [0041] El término "profármaco" como se utiliza en este caso se destina a indicar un compuesto que no o que necesariamente no tiene una actividad terapéutica pero que sobre administración se transforma en un compuesto terapéuticamente activo por una reacción en el cuerpo. Típicamente tales reacciones son hidrólisis, por ejemplo por esterases u oxidaciones. Ejemplos de profármacos incluyen amidas biohidrolizables y ésteres biohidrolizables y también encierra a) compuestos en los que la funcionalidad biohidrolizable en tal profármaco se encierra en el compuesto según la presente invención, y b) compuestos que pueden ser oxidados o reducidos biológicamente a un dado grupo funcional para producir sustancias de fármaco según la presente invención. Ejemplos de estos grupos funcionales incluyen 1,4-dihidropiridina, n-alquicarbonilo-1,4-dihidropiridina, 1,4-ciclohexadieno, terc-butilo, y similares.

40 [0042] Como se utiliza en este caso, el término "éster biohidrolizable" es un éster de una sustancia de fármaco (en caso, un compuesto según la invención) que bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia progenitora pero confiere a esta sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de acción, aparición de acción, y similares, o b) es biológicamente inactivo pero es fácilmente convertido in vivo por el sujeto al principio biológicamente activo. La ventaja es, por ejemplo, solubilidad aumentada o que el éster biohidrolizable sea absorbido por vía oral del intestino y se transforme en un compuesto según la presente invención en plasma. Muchos ejemplos de tal se conocen en la técnica e incluyen por vía de ejemplo ésteres de alquilo inferiores (p. ej., C₁-C₄), ésteres de aciloxialquilo inferiores, ésteres de alcoxialquilo inferiores, ésteres de alquilo de acilamino de alquilo y ésteres de colina.

45 [0043] Como se utiliza en este caso, el término "amida biohidrolizable" es una amida de una sustancia de fármaco (en caso, un compuesto según la presente invención) que bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia progenitora pero confiere en esta sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de acción, aparición de acción, y similares, o b) es biológicamente inactivo pero es fácilmente convertido in vivo por el sujeto al principio biológicamente activo. La ventaja es, por ejemplo solubilidad aumentada o que la amida biohidrolizable sea absorbida por vía oral del intestino y se transforme en un compuesto según la presente invención en plasma. Muchos ejemplos de tal se conocen en la técnica e incluyen por ejemplo amidas de alquilo inferiores, amidas de α -amino ácidos, amidas de alcoxialquilo y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo.

50 [0044] En el presente contexto, el término "sal aceptable farmacéuticamente" se destina a indicar sales que no son nocivas para el paciente. Tales sales incluyen sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables, sales metálicas aceptables farmacéuticamente, amonio y sales amónicas alquiladas. Sales de adición ácidas incluyen sales de ácidos inorgánicos al igual que ácidos orgánicos. Ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen, bromhídrico yodhídrico, fosfórico, ácidos sulfúricos nítricos y similares. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maléico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamóico, bismetileno, salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico p-aminobenzoico glutámico, benzenosulfónico, ácidos de p-toluensulfónico y similares. Más ejemplos de sales con adición de ácidos inorgánicos u orgánicos incluyen las sales farmacéuticamente aceptables catalogadas en J. Pharm. Sci. 1977, 66,2, . Ejemplos de sales metálicas incluyen litio, sodio, potasio, sales magnésicas y similares. Ejemplos de amonio y sales amónicas alquiladas incluyen amonio, metilamonio, dimetilamonio,

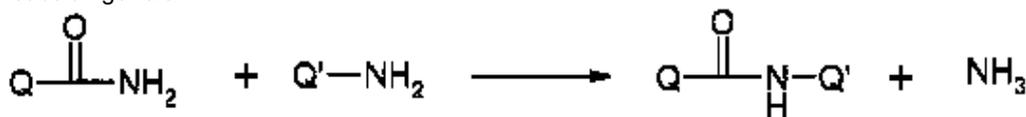
trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, sales de tetrametilamonio y similares.

[0045] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto como se utiliza en este caso significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto es definida como "cantidad terapéuticamente eficaz". Cantidades eficaces para cada fin dependerán de la gravedad de la enfermedad o herida al igual que del peso y estado general del sujeto. Será entendido que determinar una dosificación apropiada puede ser conseguido usando experimentación rutinaria, por construcción de una matriz de valores y puntos diferentes de análisis en la matriz, lo que está dentro de las habilidades comunes de un médico adiestrado o veterinario.

[0046] El término "tratamiento" y "tratar" como se utiliza en este caso significa la gestión y cuidado de un paciente con motivo de combatir una condición, tal como una enfermedad o un trastorno. El término se destina a incluir el espectro completo de tratamientos para una condición dada donde el paciente está sufriendo, tal como administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retardar la progresión de la enfermedad, trastorno o condición, para aliviar o paliar los síntomas y complicaciones, y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o condición al igual que para prevenir la condición, donde prevención debe ser entendida como la gestión y cuidado de un paciente con motivo de combatir la enfermedad, condición o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones. El paciente a ser tratado es preferiblemente un mamífero, en particular un ser humano, pero pueden también incluirse animales, tales como perros, gatos, vacas, oveja y cerdos.

Descripción de la invención

[0047] Transglutaminasa (E.C.2.3.2.13) es también conocida como proteína-glutamina-γ-glutamyltransferasa y cataliza la reacción general



[0048] En una forma de realización, Q-C(O)-NH₂ (aceptor de amina) representa una glutamina con péptido y Q'-NH₂ (donante de amina) luego representa un primer compuesto, como se ha indicado anteriormente, o Q-C(O)-NH₂ representa un primer compuesto como se ha indicado anteriormente y Q'-NH₂ luego representa una lisina con péptido. En una forma de realización particular, no obstante, Q-C(O)-NH₂ representa una glutamina con péptido y Q'-NH₂ representa un primer compuesto como se ha indicado anteriormente.

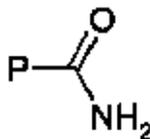
[0049] Un donante de amina *in vivo* común es la lisina unida al péptido y la reacción anterior luego provee reticulación de péptidos. El factor de coagulación Factor XIII es una transglutaminasa que hace coagulación de sangre sobre heridas. Transglutaminasas diferentes difieren entre sí, por ejemplo en que residuos de aminoácidos alrededor del Gln se requieren para la proteína para ser un sustrato, es decir transglutaminasas diferentes tendrán péptidos diferentes con Gln como sustratos dependiendo de qué residuos de aminoácidos son vecinos del residuo de Gln. Este aspecto puede ser aprovechado si un péptido a ser modificado contiene más de un residuo de Gln. Si se desea selectivamente conjugar el péptido sólo en algunos de los residuos de Gln presentes, esta selectividad puede ser obtenida seleccionando una transglutaminasa que sólo acepta el residuo(s) de Gln pertinente como sustrato. Alternativamente, uno o más residuos de aminoácidos cerca un Gln puede ser alterado, por ejemplo mediante ingeniería genética para modificar la actividad de una transglutaminasa dada a dicho residuo de Gln.

[0050] Es reconocido que un compuesto sea o no un sustrato para una enzima dada en principio depende de las condiciones de reacción, por ejemplo el bastidor de tiempo. Dado tiempo suficiente, muchos compuestos que no son normalmente considerados como sustratos son, de hecho, sustratos. Cuando se declara sobre esto que para una transglutaminasa dada algunos residuos de Gln pueden ser sustratos mientras otros no son se destina a indicar que "otros no son" al punto dónde la selectividad deseada puede todavía ser conseguida. Si uno o más residuos de Gln, que se desea que queden no conjugados, es, de hecho, un sustrato para transglutaminasa, no obstante, sólo si en el contacto con transglutaminasa para un periodo temporal extendido, selectividad puede ser conseguida eliminando o inactivando la transglutaminasa después de un tiempo adecuado.

[0051] Ejemplos de transglutaminasas útiles incluyen transglutaminasas microbianas, tal como por ejemplo de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* y *Streptomyces griseocarneum* (todos descritos en US 5,156,956), y *Streptomyces lavendulae* (descritos en US 5.252.469) y *Streptomyces ladakanum* (JP2003199569). Debe señalarse que elementos del género anterior de *Estreptoverticilio* son ahora incluidos en el género *Streptomyces* [Kaempfen, J.Gen.Microbiol., 137, 1831-1892,1991]. Otras transglutaminasas útiles microbianas han sido aisladas de *Bacillus subtilis* (descritas en US 5.731.183) y de varios mixomicetos. Otros ejemplos de transglutaminasas útiles microbianas son aquellas descritas en WO 96/06931 (p. ej. transglutaminasa de *lidicus* de bacilo) y WO 96/22366. Transglutaminasas útiles no microbianas incluyen transglutaminasa de hígado de conejillo de Indias, y transglutaminasas de varias fuentes marinas como el pescado plano *Pagrus major* (descritas en EP-0555649), y la ostra japonesa gigas de *Crassostrea* (descrita en US 5.736.356).

[0052] En una forma de realización, Q'-NH₂, es decir, el primer compuesto como se ha indicado anteriormente, es un nitrógeno con nucleófilo, donde un nucleófilo se entiende como un compuesto básico rico de electrón que tiende a atacar el núcleo de carbono. Un nitrógeno con nucleófilo puede por ejemplo ser una amina o un derivado de oxi amina.

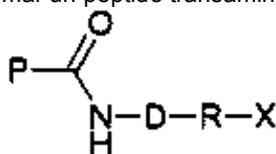
[0053] En una forma de realización, la invención se refiere a un método de péptidos de conjugación, donde un residuo de Gln con péptido representado por la fórmula



se reacciona en uno o más pasos con un nitrógeno con nucleófilo (primer compuesto) representado por la fórmula



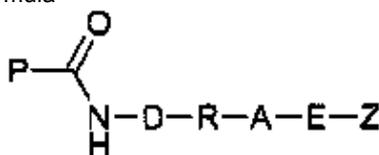
en presencia de una transglutaminasa para formar un péptido transaminado de la fórmula



opcionalmente dicho grupo latente funcional en X es luego activado, dicho péptido transaminado siendo además reaccionado con un segundo compuesto de la fórmula



para formar un péptido conjugado de la fórmula



donde D representa un enlace u oxígeno;

R representa un enlazador o un enlace;

X representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales o grupos latentes funcionales no accesibles en los residuos de aminoácido que constituyen el péptido P-C(O)-NH₂;

Y representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales que grupos reaccionan con grupos funcionales presentes en X, y que grupos funcionales no reaccionan con grupos funcionales accesible en el péptido P-C(O)-NH₂;

E representa un enlazador o un enlace;

A representa una oxima, hidrazono, fenilhidrazona, semicarbazona, triazol o fracción de isooxazolidina, la fracción formada por la reacción entre el par de grupos funcionales comprendido en X y Y; y Z es la fracción a ser conjugada al péptido.

[0054] Después de la conjugación, el péptido conjugado se puede aislar y purificar por técnicas bien conocidas en la técnica. El péptido conjugado puede también ser convertido en una sal aceptable farmacéuticamente o profármaco, si pertinente.

[0055] En particular, dicho método puede también comprender un paso donde el resultante péptido conjugado se formula como una composición farmacéutica.

[0056] La fracción A formada en la reacción entre los grupos funcionales de X e Y puede en principio ser de cualquier tipo dependiendo de qué propiedades del péptido conjugado final son deseadas. En alguna situación puede ser deseable tener un enlace lábil que se puede dividir en alguna fase posterior, por ejemplo por alguna acción enzimática o por fotólisis. En otras situaciones, puede ser deseable tener un enlace estable, de modo que un péptido estable conjugado se obtiene. Se hace una mención particular del tipo de fracciones formadas por reacciones entre derivados de amina y grupos de carbonilo, tal como oxima, hidrazono, fenilhidrazona y fracciones de semicarbazona.

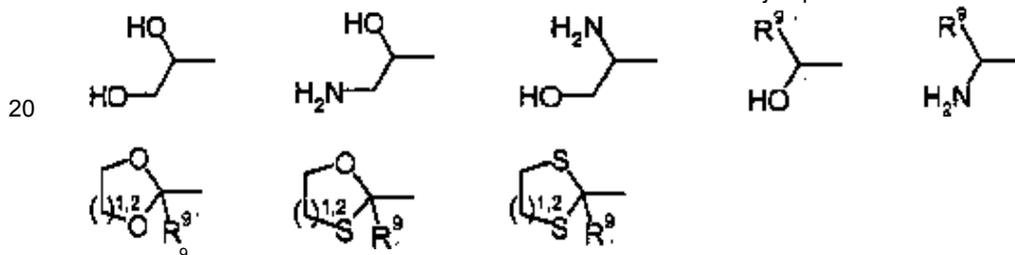
[0057] En una forma de realización los grupos funcionales de X e Y se seleccionan de entre grupos de carbonilo, tal como ceto y grupos de aldehído, y derivados de amino, tal como derivados de hidracina-NH-NH₂, derivados de carboxilato de hidracina-O-C(O)-NH-NH₂, derivados de semicarbazida-NH-C(O)-NH-NH₂,

derivados de tiosemicarbazida-NH-C(S)-NH-NH₂,
 derivados de dihidracida de ácido carbónico-NHC(O)-NH-NH-C(O)-NH-NH₂,
 derivados de carbazida-NH-NH-C(O)-NH-NH₂,
 derivados de tiocarbazida-NH-NH-C(S)-NH-NH₂,
 5 derivados de hidracina de arilo-NH-C(O)-C₆H₄-NH-NH₂, y
 derivados de hidrácida-C(O)-NH-NH₂; o
 derivados de oxilamina, tal como-O-NH₂, -C(O)-O-NH₂, -NH-C(O)-O-NH₂ y -NH-C(S)-O-NH₂.

[0058] Debe entenderse, que si el grupo funcional comprendido en X es un grupo carbonilo, luego el grupo funcional comprendido en Y es un derivado de amina, y viceversa. Debido a la presencia de grupos-NH₂ en más péptidos, se cree que es obtenida una mejor selectividad si X comprende una funcionalidad de ceto o de aldehído.

[0059] Otro ejemplo de un par adecuado de grupos funcionales presente en X e Y se deriva de azida (-N₃) y alquinas que reaccionan para formar una fracción de triazol. Todavía otro ejemplo de un par adecuado es alquina y nitril-óxido que reaccionan para formar una fracción de isooxazolidina.

[0060] Debe entenderse que el grupo funcional comprendido en X puede estar latente en el sentido de que tiene a ser activado antes de la reacción con Y-E-Z. Por ejemplo, X puede comprender una fracción que sobre reacción con un reactivo adecuado se transforma a un aldehído o una cetona. Ejemplos de tales fracciones incluyen



donde R⁹ representa H, C₁₋₆ alquilo, arilo o heteroarilo. Ejemplos Particulares incluyen metilo, etilo y propilo. Dichas fracciones se pueden transformar para un aldehído o cetona por oxidación con un agente adecuado, tal como por ejemplo perodato, o por hidrólisis con un ácido acuoso, opcionalmente en presencia de un catalizador, tal como cobre, plata o sales de mercurio.

[0061] En particular, el compuesto de la fórmula (primer compuesto),

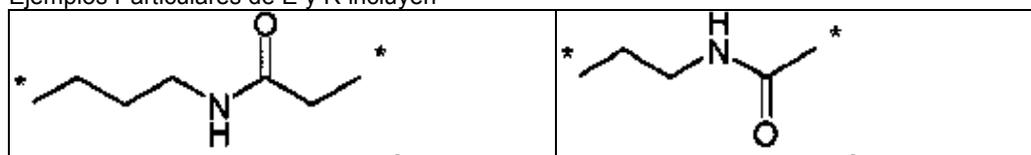


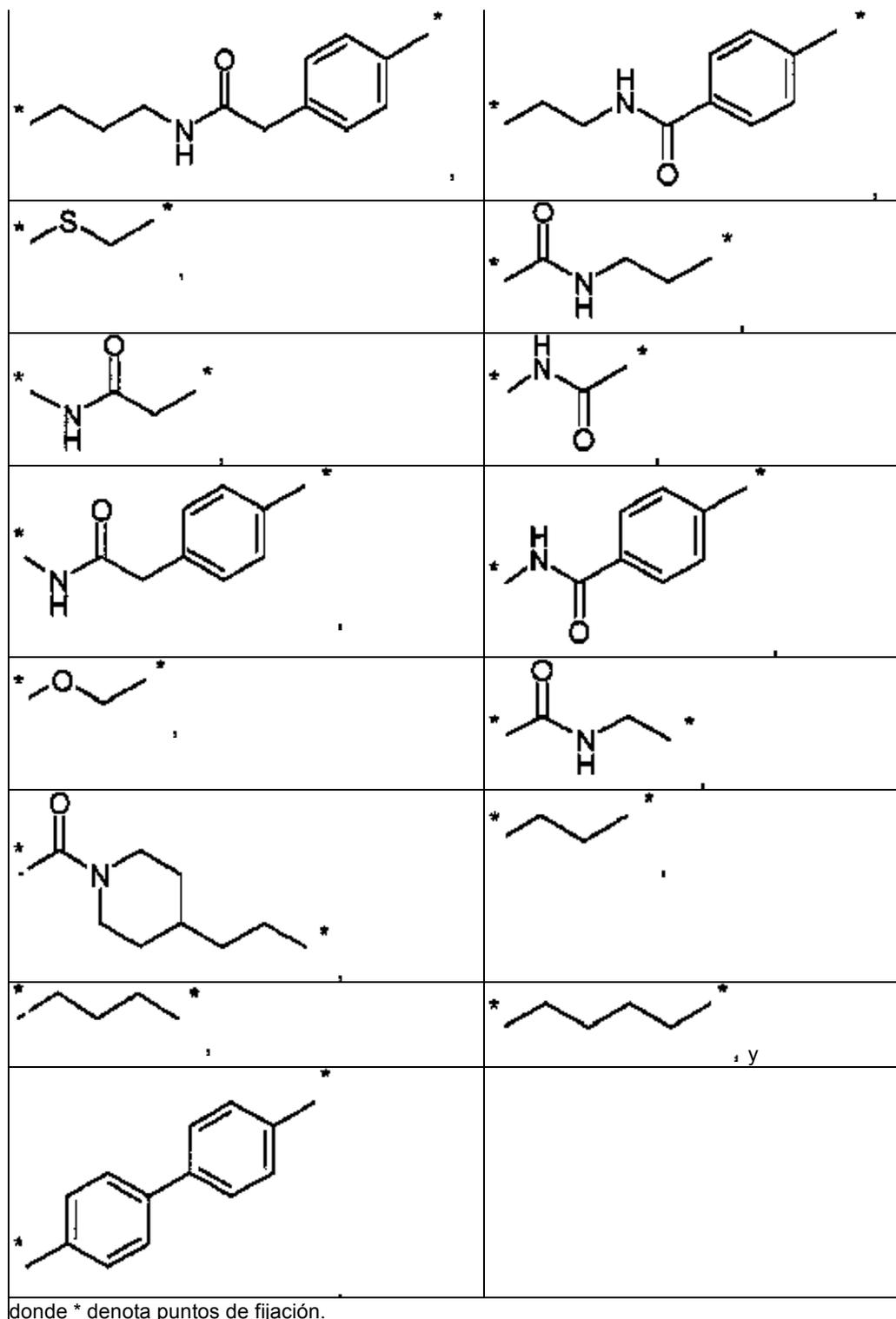
se puede seleccionar de entre 4-(aminometil)fenil etanona, 4-(2-aminoetil)fenil etanona, N-(4-acetilfenil) 2-aminoacetamida, 1-[4-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1-[3-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1,4-bis(aminox)butano, 3-oxapentano-1,5-dioxiamina, 1,8-diaminox-3,6-dioxaoctano, 1,3-bis(aminox)propano-2-ol, 1,11-bis(aminox)-3,6,9-trioxaundecano, 1,3-diamino-2-propanol, 1,2-bis(aminox)etano y 1,3-bis(aminox)propano.

[0062] Tanto el compuesto para transaminar (primer compuesto) y el compuesto para ser reaccionado con el péptido transaminado (segundo compuesto) comprenden un enlazador, R y E, respectivamente. Estos enlaces, que son independientes uno del otro, pueden estar ausentes o seleccionados de entre diradicales de alcano, alqueno o alquina y diradicales de hetero alcano, hetero alqueno y hetero alquina, donde uno o más biradicales opcionalmente sustituidos homocíclicos aromáticos o biradicales de un compuesto heterocíclico, por ejemplo fenileno o biradical de piperidina se pueden insertar en los biradicales mencionados. Debe entenderse que dichos enlaces pueden también comprender sustituciones por grupos seleccionados de entre hidróxilo, halógeno, nitro, ciano, carboxilo, arilo, alquilo y heteroarilo.

[0063] Ambos E y R representan vínculos o enlaces, y en el presente contexto el término "enlazador" se destina a indicar un funcionamiento de fracción como unos medios para separar Y de Z y X de NH₂-D-, respectivamente. Una función de los enlaces E y R puede ser para proporcionar flexibilidad adecuada en la conexión entre el péptido y la fracción conjugada Z. Ejemplos típicos de E y R incluyen, alquileno C₁₋₁₀ lineal, ramificado y/o cíclico, alquenileno C₂₋₁₀, alquinileno C₂₋₁₀, heteroalquileno C₂₋₁₀, heteroalquenileno C₂₋₁₀, heteroalquileno C₂₋₁₀, donde puede ser insertado uno o más biradicales de compuesto aromático homocíclico o biradical de compuesto heterocíclico.

Ejemplos Particulares de E y R incluyen





[0064] Una necesidad para modificar péptidos puede surgir para cualquier número de cuestiones, y esto es también reflejado en los tipos de compuestos que se pueden conjugar para péptidos según los métodos de la presente invención. Puede ser deseable conjugar péptidos para alterar las propiedades físico químicas del péptido, tal como por ejemplo para aumentar (o reducir) solubilidad para modificar la biodisponibilidad de péptidos terapéuticos. En otra forma de realización, puede ser deseable modificar el índice del aclaramiento en el cuerpo conjugando compuestos al péptido que se enlaza a proteínas plasmáticas, tal como por ejemplo albúmina, o que aumenta el tamaño del péptido para prevenir o retrasar la secreción a través de los riñones. La conjugación puede también alterar y en particular reducir la susceptibilidad de un péptido para hidrólisis, tal como por ejemplo proteólisis de in vivo. En otra forma de realización, puede ser deseable conjugar una etiqueta para facilitar análisis del péptido. Ejemplos de tal marcador incluyen isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes y sustratos enzimáticos. En otra forma de realización, un compuesto se conjuga a

un péptido para facilitar aislamiento del péptido. Por ejemplo, un compuesto con una afinidad específica a un material de columna particular se puede conjugar al péptido. Puede también ser deseable modificar la inmunogenicidad de un péptido, por ejemplo al conjugar un péptido para esconder, enmascarar o eclipsar uno o más epítomos inmunogénicos en el péptido.

[0065] En una forma de realización, la invención proporciona un método de propiedades farmacológicas de mejora de péptidos. La mejora es con respecto al péptido correspondiente no-conjugado. Ejemplos de tales propiedades farmacológicas incluyen vida media de in vivo funcional, inmunogenicidad, filtración renal, protección de proteasa y unión de albúmina.

[0066] El término "vida media de in vivo funcional" se usa en su significado normal, es decir, el tiempo en el que 50% de la actividad biológica del péptido o péptido conjugado está todavía presente en el órgano del cuerpo/objetivo, o el tiempo en el que la actividad del péptido o péptido conjugado es 50% de su valor inicial. Como una alternativa para determinar la vida media de in vivo funcional, "vida media de plasma de in vivo" puede ser determinada, es decir, el tiempo en el que 50% del péptido o péptido conjugado circula en el plasma o flujo sanguíneo antes de ser esclarecido. Determinar la vida media de plasma es frecuentemente más simple que determinar la vida media funcional y la magnitud de vida media de plasma es normalmente una buena indicación de la magnitud de vida media de in vivo funcional. Términos alternativos para vida media de plasma incluyen vida media de suero, vida media circulante, vida media circulatoria, aclaramiento de suero, aclaramiento de plasma y vida media del aclaramiento.

[0067] El término "aumentado" como se usa en conexión con la vida media de in vivo funcional o vida media de plasma se utiliza para indicar que la vida media pertinente del péptido conjugado ha estadísticamente de forma significativa aumentado en relación a aquel del no-conjugado (progenitor) péptido, como determinado bajo condiciones comparables. Por ejemplo la vida media pertinente se puede aumentar por al menos aproximadamente 25%, tal como por al menos aproximadamente 50%, por ejemplo, por al menos aproximadamente 100%, 150%, 200%, 250%, o 500%. En una forma de realización, los compuestos de la presente invención muestran un aumento en la vida media de al menos aproximadamente 5 h, preferiblemente al menos aproximadamente 24 h, más preferiblemente al menos aproximadamente 72 h, y de la forma más preferible al menos aproximadamente 7 días, relativamente a la vida media del péptido progenitor.

[0068] Medición de vida media de plasma *in vivo* puede llevarse a cabo de varias formas como se describe en la bibliografía. Un aumento en la vida media de plasma de in vivo se puede cuantificar como una reducción en el aclaramiento (CL) o como un aumento en el periodo de permanencia media (MRT). Péptidos conjugados de la presente invención para que el CL disminuya a menos del 70%, tal como menos del 50%, tal que menos del 20%, tal que menos del 10% del CL del péptido progenitor como determinado en un ensayo adecuado, es dicho que tiene una vida media de plasma de in vivo aumentado. Péptidos conjugados de la presente invención para que MRT se aumente a más del 130%, tal como más del 150%, tal como más del 200%, tal como más del 500% del MRT del péptido progenitor en un ensayo adecuado es dicho que tiene una vida de mitad de plasma de in vivo aumentado. Aclaramiento y periodo de permanencia media se puede evaluar en estudios farmacocinéticos estándar usando los animales de experimentación adecuados. Está dentro de las capacidades de un experto en la técnica elegir un animal de prueba adecuada para una proteína dada. Pruebas en el humano, por supuesto, representan la prueba definitiva. Típicamente, y como un ejemplo, los ratones, ratas, perros, simios o cerdos son inyectados con el compuesto de interés. La cantidad inyectada depende del animal de prueba. Posteriormente, muestras de sangre se toman durante un periodo de uno a cinco días, como sea apropiado, para la evaluación de CL y MRT. Las muestras de sangre son convenientemente analizadas por técnicas de ELISA.

[0069] El término "Inmunogenicidad" de un compuesto se refiere a la capacidad del compuesto, cuando administrado a un humano, para suscitar una respuesta inmunitaria deletérea, ya sea, humoral, celular, o ambas. En cualquier subpoblación humana, pueden existir individuos que muestran sensibilidad para proteínas particulares administradas. Inmunogenicidad se puede medir al cuantificar la presencia de anticuerpos de hormona de crecimiento y/o células T sensibles de hormona de crecimiento en un individuo sensible, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En una forma de realización, el péptido conjugado de la presente invención muestra una reducción en la inmunogenicidad de un individuo sensible de al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente 40% y más preferiblemente al menos aproximadamente 50%, relativamente a la inmunogenicidad para este individuo del péptido progenitor.

[0070] El término "protección de proteasa" o "proteasa protegida" como se utiliza en este caso se destina a indicar que el péptido conjugado de la presente invención es más resistente a la peptidasa de plasma o proteasas que el péptido progenitor. Proteasa y enzimas de peptidasa presentes en plasma se conocen por estar implicadas en la degradación de proteínas circulantes.

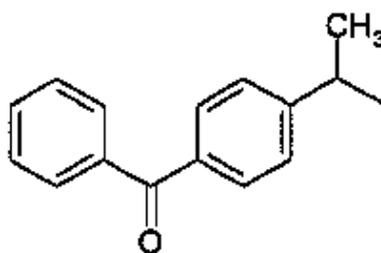
[0071] Resistencia de una proteína a la degradación por, por ejemplo, dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP-IV) se determina por el siguiente ensayo de degradación: partes alícuotas de la proteína (5 nmol) se incuban a 37 °C con 1 µL de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 µL de 0,1 M tampón de trietilamina-HCl, pH 7, 4. Reacciones enzimáticas se terminan por la adición de 5 µL de 10% ácido trifluoroacético, y los productos de degradación de proteína se separan y cuantifican mediante análisis de

HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican sobre un vidac C18 poro ancho (30 nm poros, 5 µm partículas) 250 x 4, 6 mm columna y eluido a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales graduales de acetonitrilo en 0,1% ácido trifluoroacético (0% acetonitrilo durante 3 min, 0-24% acetonitrilo durante 17 min, 24-48% acetonitrilo durante 1 min) según Siegel et al., Regul. Pept. 1999, 79:93-102 y Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993, 214:829-35. Proteínas y su productos de degradación se pueden monitorear por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de su áreas de valor máximo relacionadas con aquellas de estándares. El índice de hidrólisis de una proteína por dipeptidil aminopeptidasa IV se estima en tiempos de incubación que suponen menos que 10% del péptido siendo hidrolizado. En una forma de realización, el índice de hidrólisis del péptido conjugado es menos que 70%, tal como menos que 40%, tal como menos que 10% del péptido progenitor.

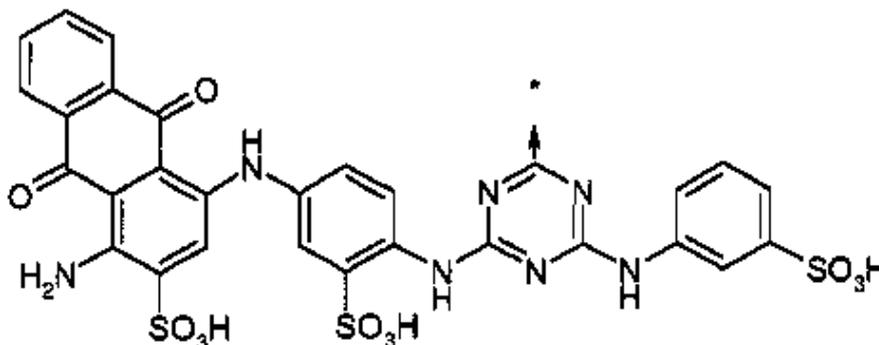
[0072] El componente de proteína más abundante en la sangre circulante de especies mamíferas es albúmina de suero, que está normalmente presente a una concentración de aproximadamente 3 a 4,5 gramos por 100 mililitros de sangre. Albúmina de suero es una proteína de sangre de aproximadamente 70.000 daltons que tiene diferentes funciones importantes en el sistema circulatorio. Funciona como un transportador de una variedad de moléculas orgánicas encontradas en la sangre, como el transportador principal de varios metabolitos tal como ácidos grasos y bilirrubina a través de la sangre, y, debido a su abundancia, como un regulador osmótico de la sangre circulante. Albúmina de suero tiene una vida media superior a una semana, y un método para aumentar la vida media de plasma de proteínas ha sido conjugado a la proteína un grupo que enlaza a albúmina de suero. Propiedad de unión de albúmina se puede determinar como se describe en J.Med.Chem, 43, 2000, 1986-1992.

[0073] Ejemplos Particulares de Z incluyen radicales que comprenden una o más etiquetas, tal como marcadores fluorescentes, tal como radical de fluoresceína, radical de rodamina, radical de Texas Red ® y radical de proteína ficobili; sustratos enzimáticos, tal como radical de acetato de p-nitrofenol; e isótopos radiactivos, tal como Cu-64; Ga67; Ga-68; Zr-89; Ru-97; Tc-99; Rh-105, Pd-109; In-111; I-123; I-125; I-131; Re-186; Re-188; Au-198; Pb-203; At-211; Pb-212 y Bi-212; fracciones orgánicas, tal como PEG o radicales de mPEG y derivados de amino de la misma (incluida PEG ramificada y lineal y radicales de mPEG); C₁₋₂₂ alquilo lineal, ramificado y/o cíclico, alqueno C₂₋₂₂, alquino C₂₋₂₂, heteroalqueno C₁₋₂₂, heteroalqueno C₂₋₂₂, heteroalquino C₂₋₂₂, donde uno o más biradicales de compuesto aromático homocíclico o biradicales de compuesto heterocíclico pueden ser insertados, y donde dichos radicales C_{1-C₂₂} o C_{2-C₂₂} pueden ser opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, carboxilo, heteroarilo y arilo, donde dicho arilo o heteroarilo puede opcionalmente ser además sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, y carboxilo; radicales de esteroide; radicales lípidos; radicales polisacáridos, por ejemplo dextranos; radicales de poliamida, por ejemplo radicales de ácido poliamínico; radicales de PVP; radicales de PVA; poli(1-3-dioxalano); poli(1,3,6-trioxano); polímero de etileno/ anhídrido maléico; materiales de tinte de Cibacron, tal como azul Cibacron 3GA; cadenas de poliamida de longitud específica, como se describe en WO 00/12587 y almidón de hidroxialquilo, tal como, por ejemplo, almidón de hidroxietilo, tal como descrito en WO 02/80979.

[0074] Se hace una mención particular de alquilo C₁₀₋₂₀, tal como C₁₅ y C₁₇, y en particular lineal C₁₅ y C₁₇, y derivados de benzofenona de la fórmula



[0075] Se hace una mención particular de Z comprendiendo un radical de cibacronilo como se ha esquematizado más abajo



[0076] PEG o mPEG conjugado a un péptido según la presente invención puede ser de cualquier peso molecular. En

particular el peso molecular puede estar entre 500 y 1000.000 Da, tal como entre 500 y 500.000 Da, tal como entre 500 y 100.000 Da, tal como entre 500 y 60.000 Da, tal como entre 1000 y 40.000 Da, tal como entre 5000 y 40.000 Da. En particular, PEG con pesos moleculares de entre 10.000 Da y 40.000 Da, tal como entre 20.000 Da y 40.000 Da, tal como entre 20.000 y 30.000 Da o entre 30.000 y 40.000 Da puede ser utilizado. Se hace una mención particular de PEG o mPEG con un peso molecular de 10.000, 20.000, 30.000 o 40.000 Da.

5

[0077] Z se puede ramificar de modo que Z comprende más de una de las etiquetas anteriormente mencionadas o radicales. Por ejemplo, mPEG40K es típicamente conseguido como un mPEG ramificado con dos brazos cada uno con un mPEG20k.

10

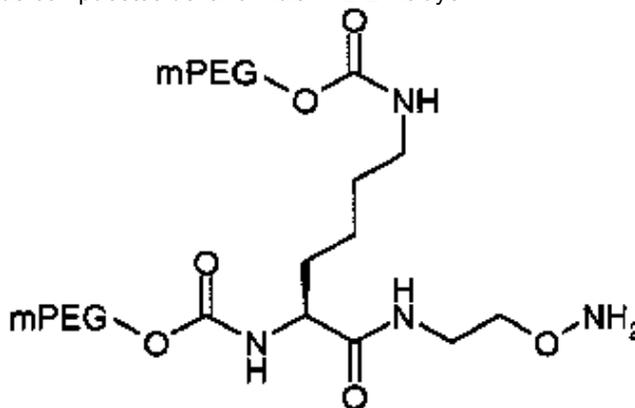
[0078] En una forma de realización, Z comprende una o más fracciones que se conocen por enlazar a proteínas plasmáticas, tal como por ejemplo albúmina. La capacidad de un compuesto para enlazar a albúmina se puede determinar como se describe en J.Med.Chem, 43, 2000, 1986-1992. En el presente contexto, un compuesto se define como unión a albúmina si Ru/Da está sobre 0,05, tal como sobre de 0,10, tal como sobre de 0,12 o incluso sobre de 0,15.

15

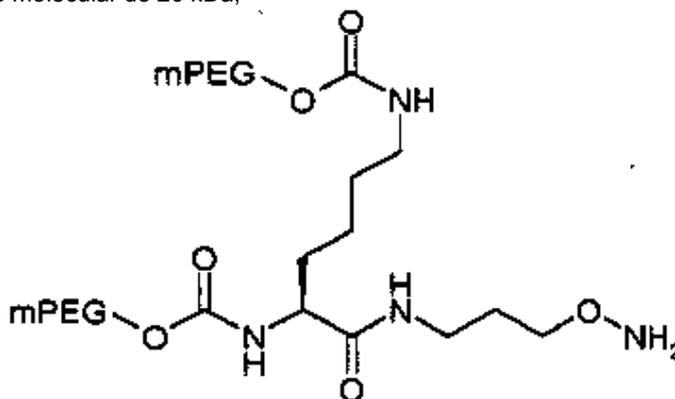
[0079] En otra forma de realización de la invención la fracción de unión de albúmina es un péptido, tal como un péptido que comprende menos que 40 residuos de aminoácidos. Varios pequeños péptidos que son fracciones de unión de albúmina, son descritos en el J. BiolChem. 277, 38 (2002)35035-35043.

20

[0080] Ejemplos Particulares de compuestos de la fórmula Y-E-Z incluye

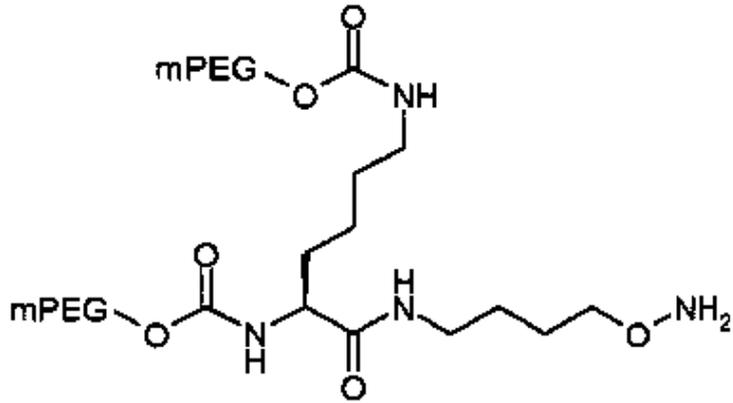


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

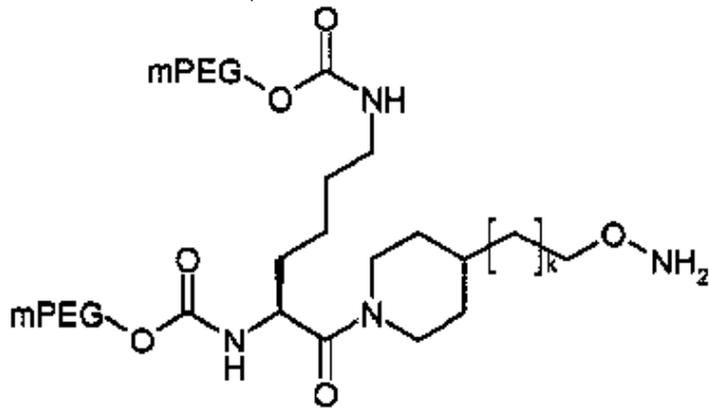


25

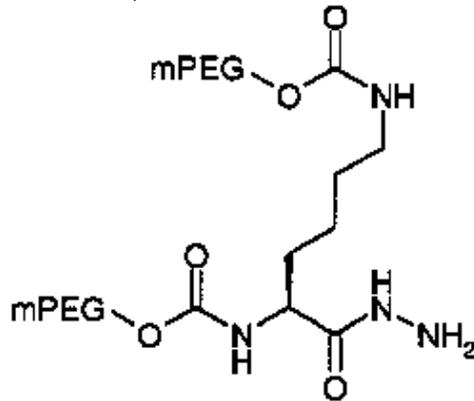
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

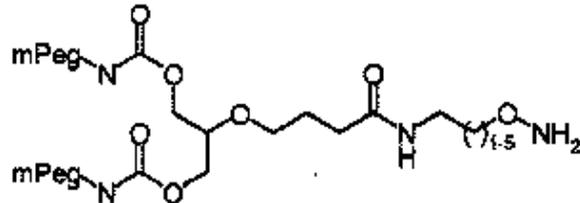


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

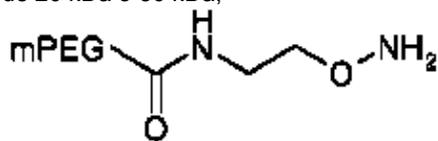


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

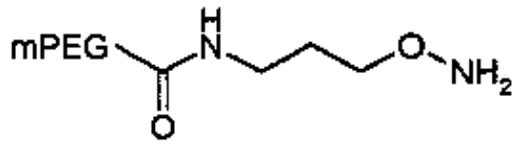


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa o 30 kDa,

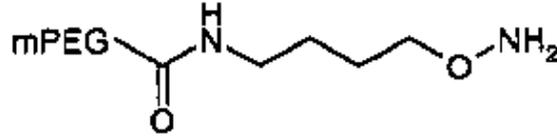


10

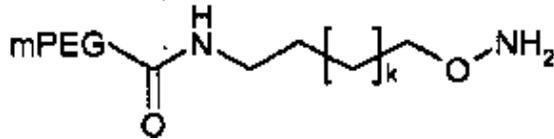
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

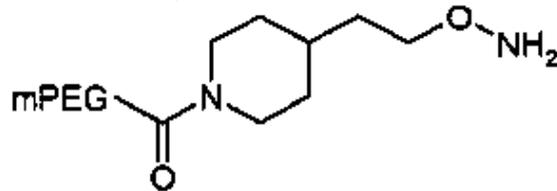


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

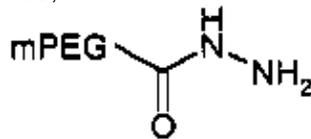


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

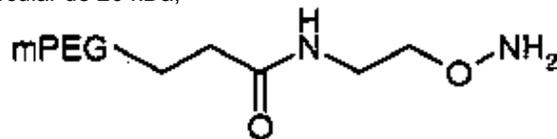


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

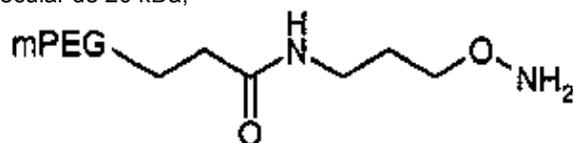


10

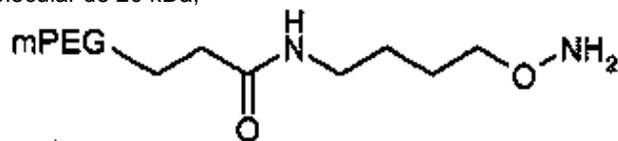
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

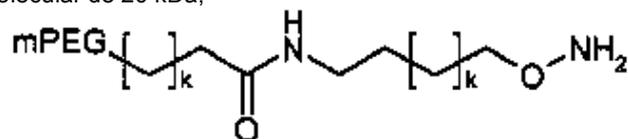


donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,

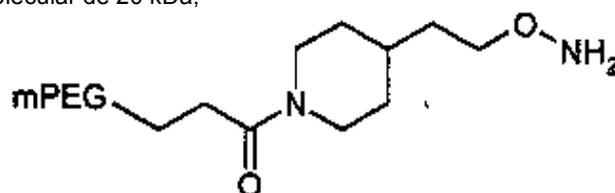


15

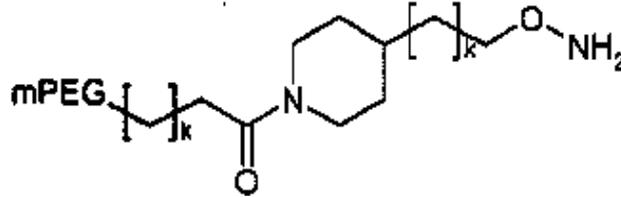
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



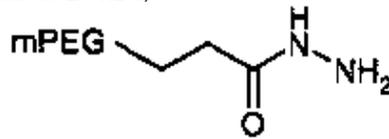
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



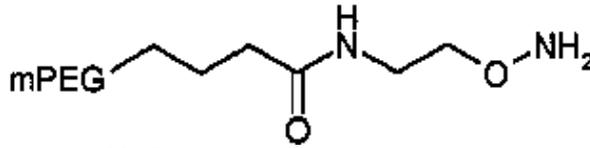
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



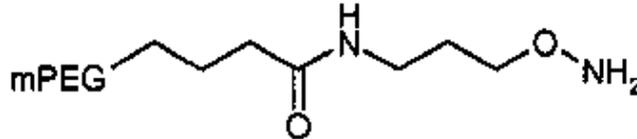
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



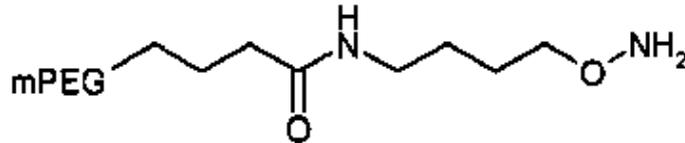
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



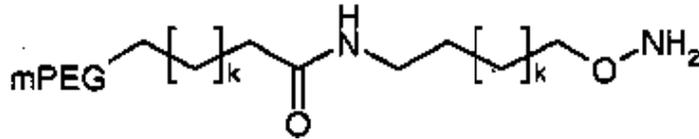
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



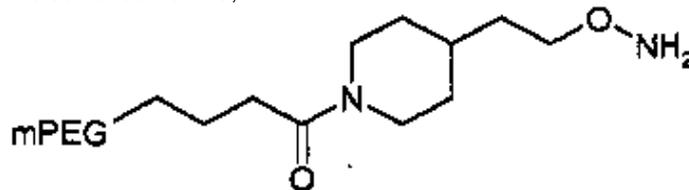
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



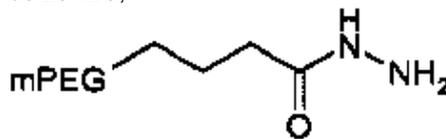
10 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



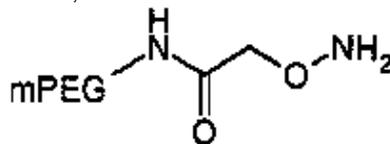
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



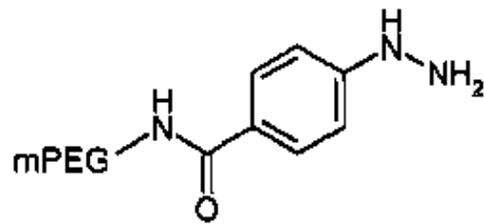
15 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



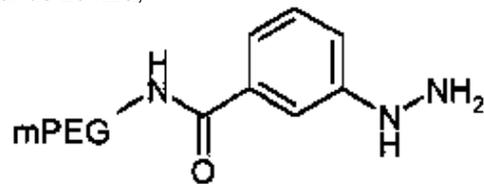
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



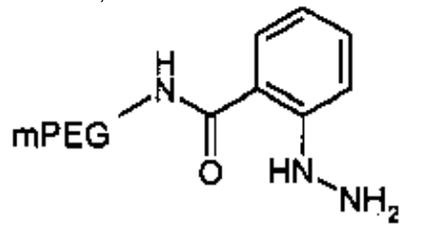
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



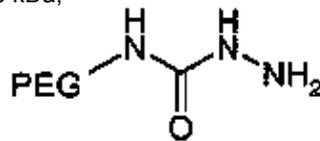
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



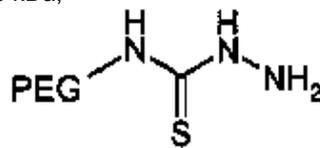
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



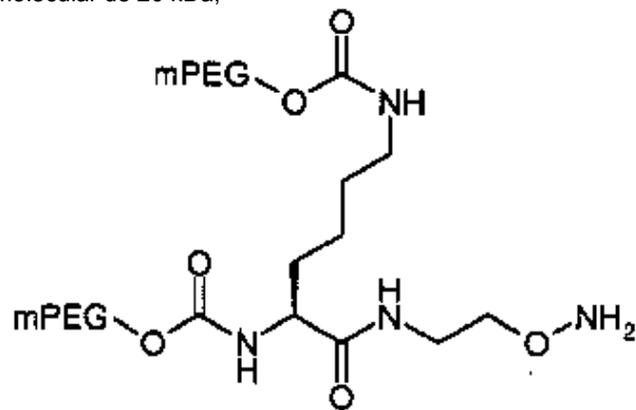
5 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



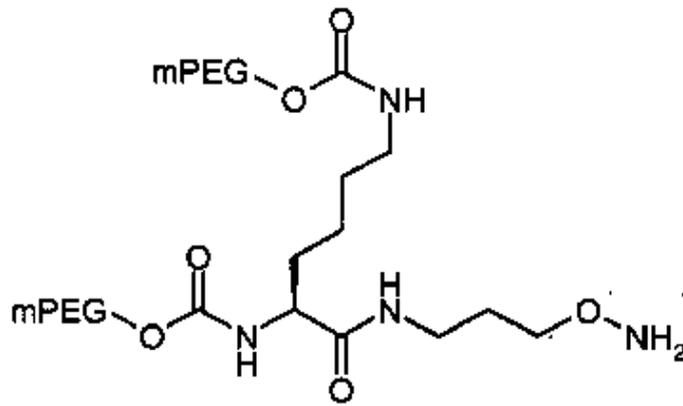
donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



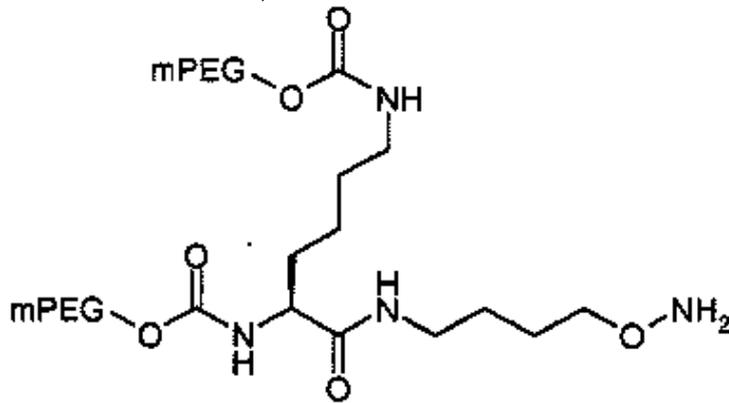
10 donde mPEG tiene un peso molecular de 20 kDa,



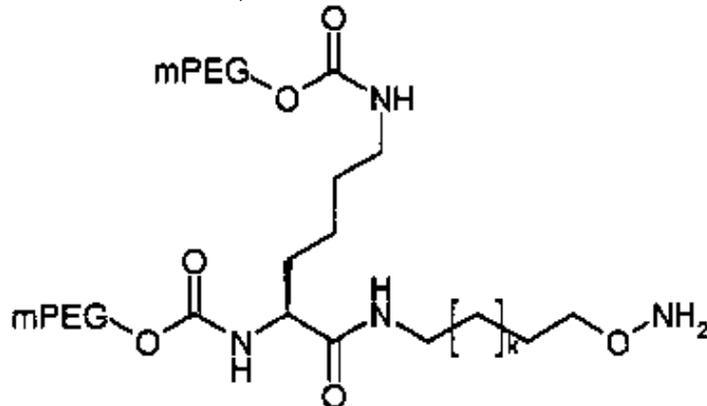
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

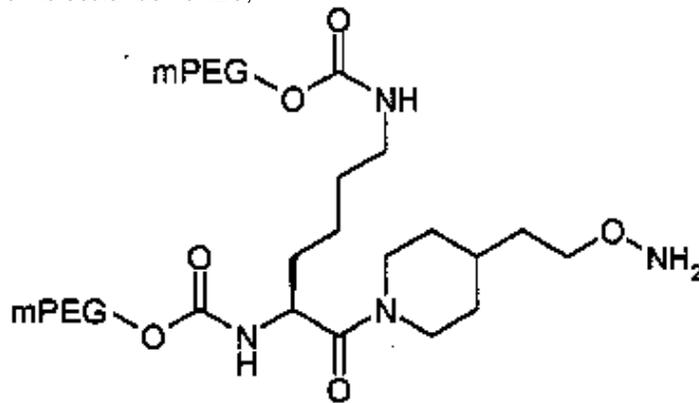


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

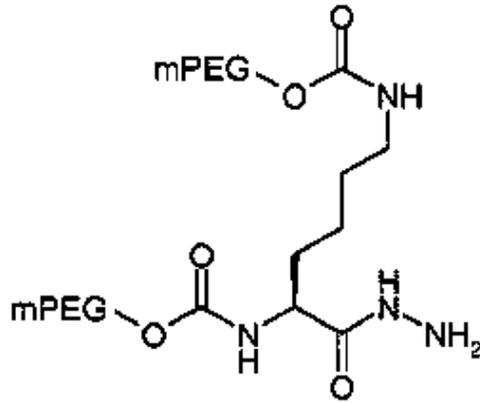


5

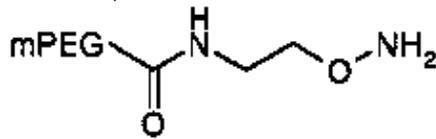
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



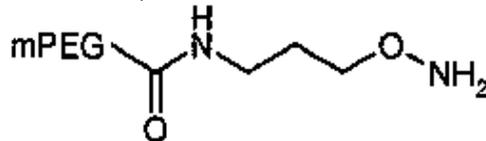
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

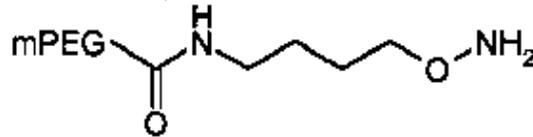


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

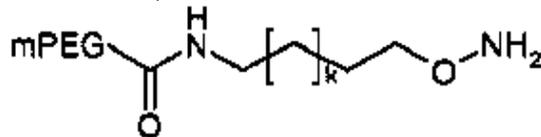


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

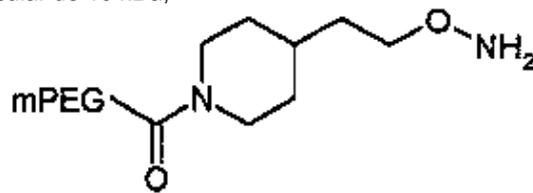


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

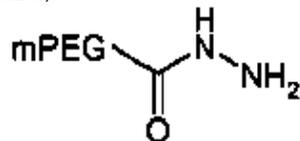


10

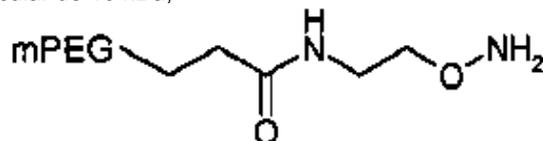
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

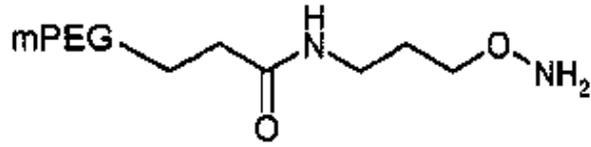


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

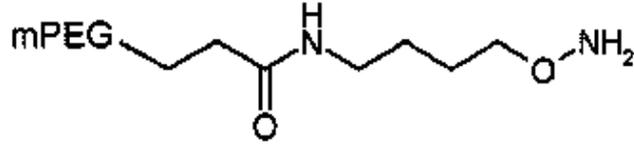


15

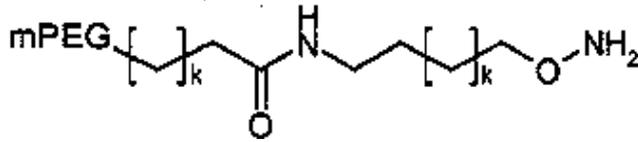
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

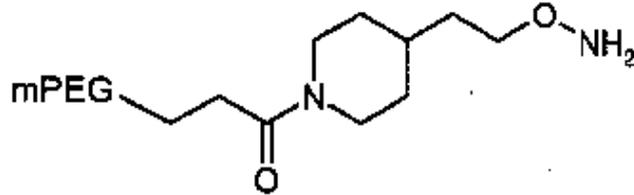


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

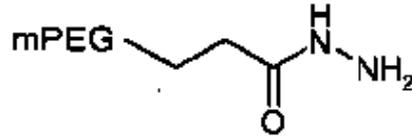


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

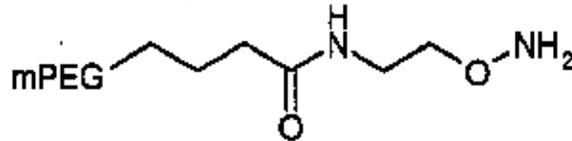


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

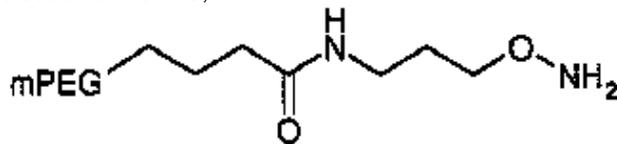


10

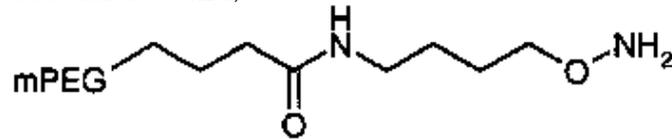
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

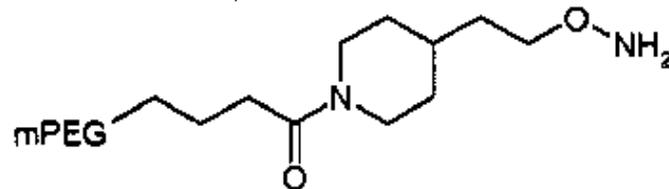


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

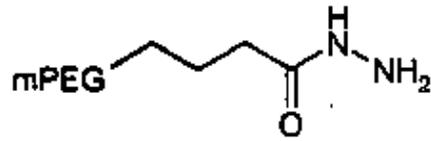


15

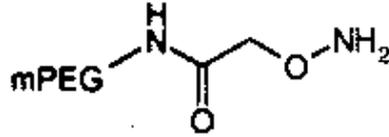
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



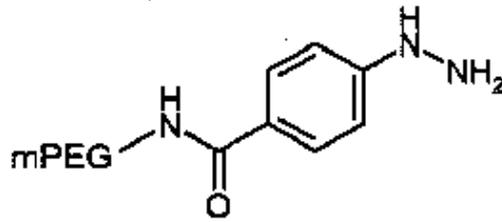
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,



donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

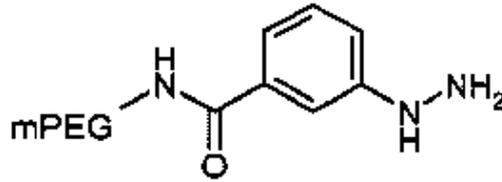


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

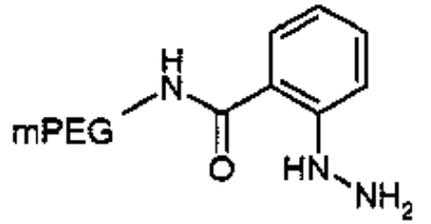


5

donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

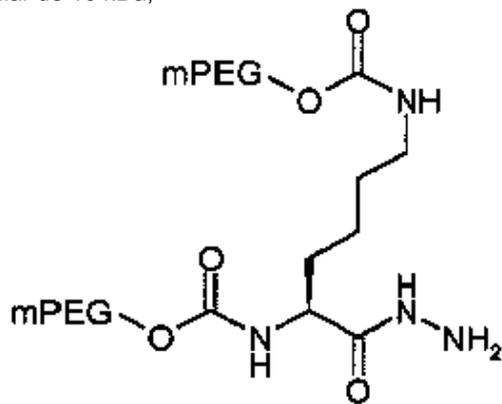


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

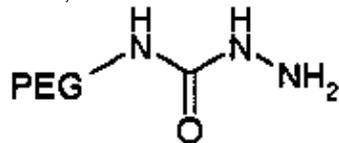


10

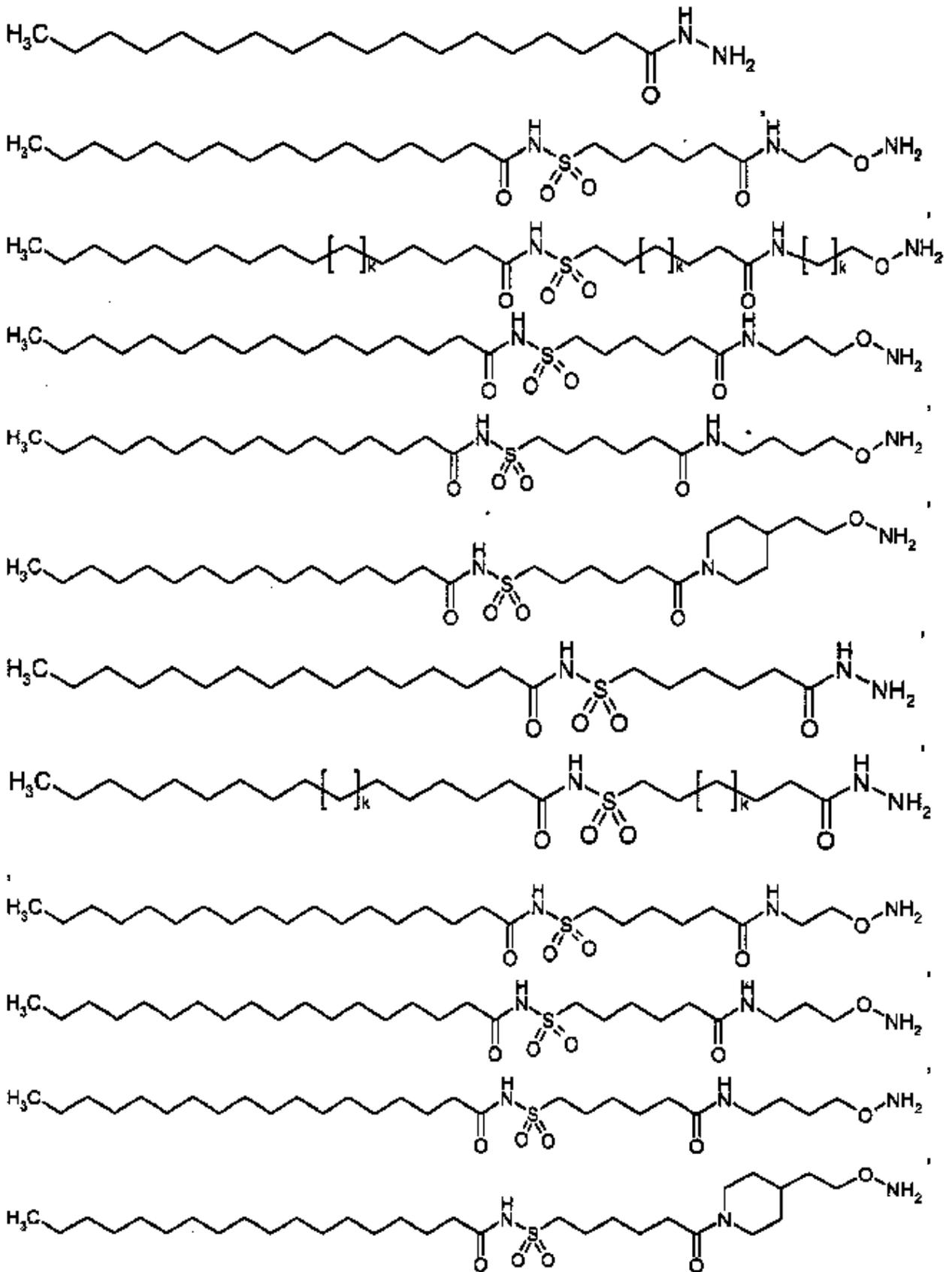
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

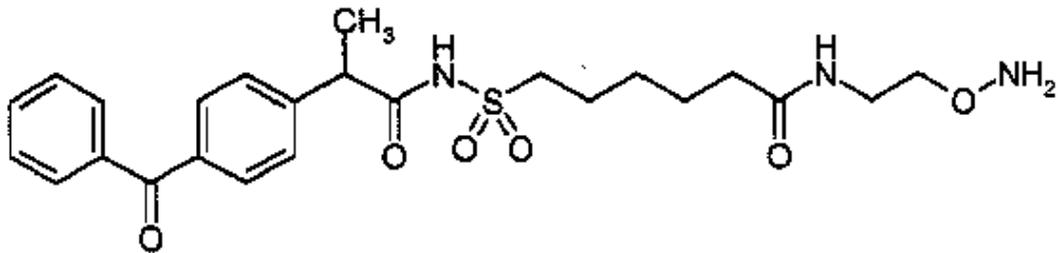
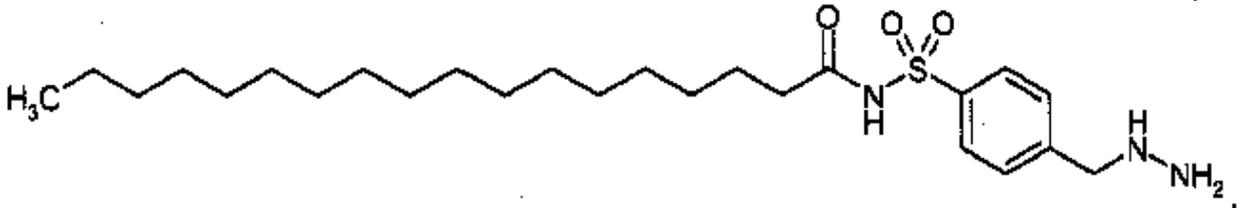
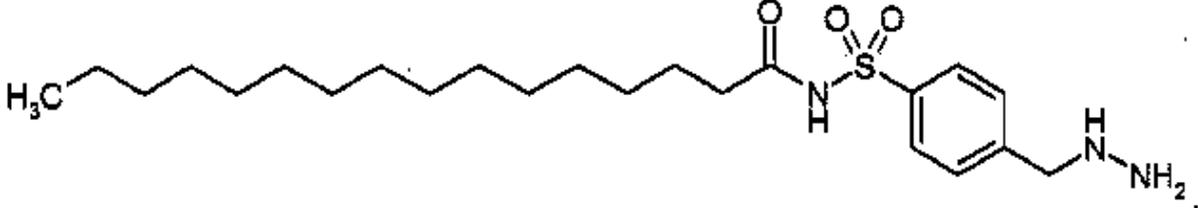
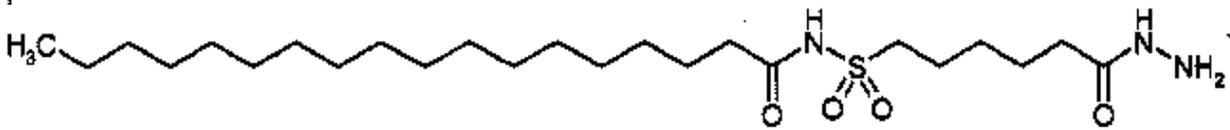
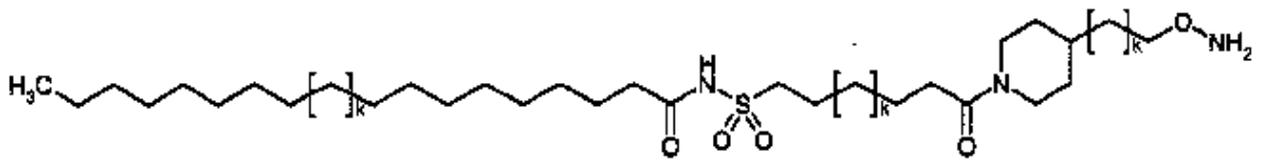


donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,

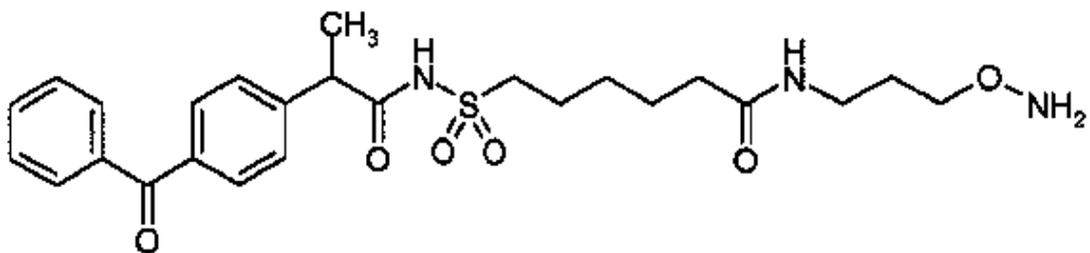
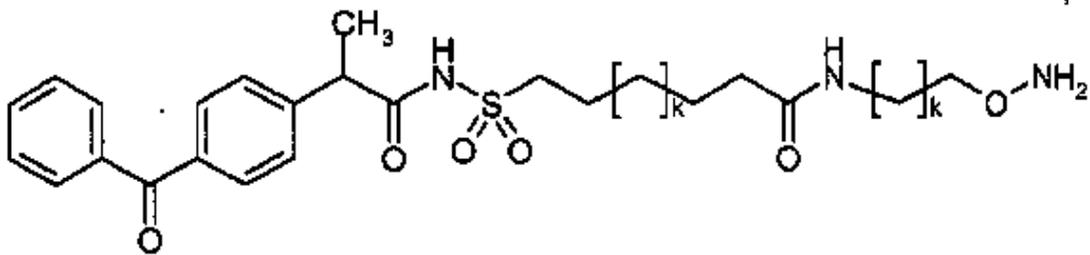


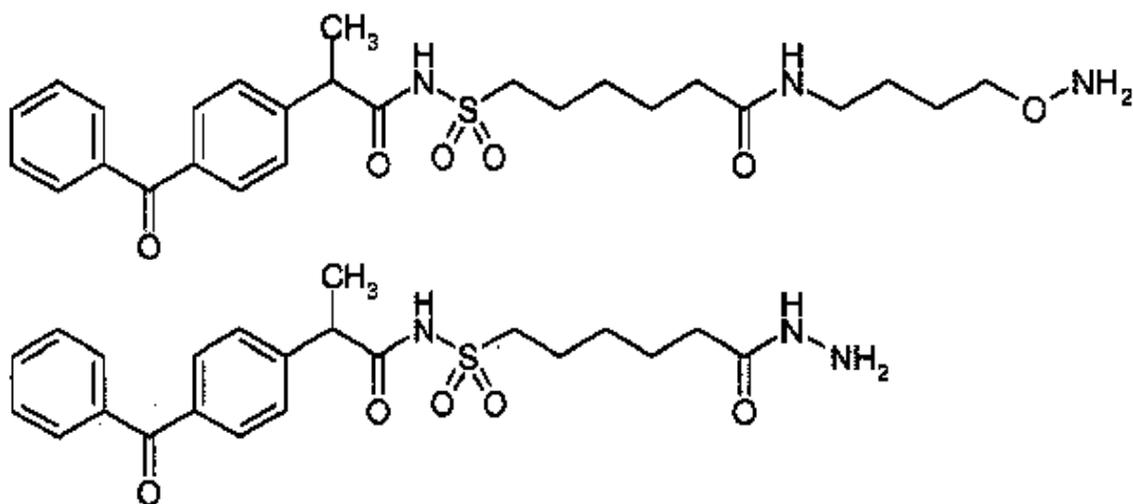
donde mPEG tiene un peso molecular de 10 kDa,





5





5 donde cada K en las fórmulas anteriores independientemente representa un número entero de 0 a 5, es decir 0, 1, 2, 3, 4 o 5.

10 [0081] Como se explica en la parte "Antecedentes de la invención", la conjugación directa de por ejemplo PEG funcionalizada de amina o ácidos grasos para Gln con péptidos es conocida. Es, no obstante, claro a partir de los ejemplos descritos en, por ejemplo EP 950665, EP 785276, Sato, Adv. Drug Delivery Rev., 54, 459-476, 2002 y Wada, Biotech. Lett., 23,1367-1372, 2001 que requiere un significativo exceso (hasta 100-1000 pliegue) del compuesto a ser conjugado al péptido para que la reacción proceda. Tal exceso constituye una limitación a la utilidad de la reacción en técnica o gran escala. Por ejemplo, mPEG con un pequeño índice de poli dispersidad es muy caro, y un requisito para un exceso grande es en practica prohibitivo. Por otra parte, para la conjugación de fracciones grandes, tal como por ejemplo PEG 10 kDa o PEG 20k Da, exceso del reactivo en el orden de 100-1000 pliegue no es realizable debido al peso molecular de tales compuestos. Es también bien conocido que la presencia de cantidades grandes de PEG es posible que precipite péptidos, es decir el péptido a ser conjugado y la transglutaminasa. En cambio aquí, el presente método en dos etapas ofrece la ventaja de que el reactivo que en el paso enzimático se requiere en gran exceso es una pequeña molécula que puede fácilmente ser manejada incluso en gran exceso. Con una selección apropiada del enlace que va a ser formado en el segundo paso no se requiere ningún gran exceso, como por ejemplo, formación de oxima tiene lugar a casi cantidades equimolares de amina y funciones de ceto.

25 [0082] Otra ventaja es la posibilidad de hacer péptidos "listos para conjugar". Un péptido se puede reaccionar con un nucleófilo adecuado (H₂ N-D-R-X) en presencia de una transglutaminasa para generar un péptido funcionalizado. Dicho péptido funcionalizado puede luego ser almacenado como sea necesario para ser reaccionado más tarde con uno o más segundos compuestos (Y-E-Z) para generar varios péptidos diferentes conjugados. Esto permite un péptido funcionalizado para ser usado para generar una multitud de péptidos conjugados. De esta manera, optimizaciones numerosas para identificar condiciones de reacción apropiadas pueden ser evitadas.

30 [0083] Un péptido tiene que ser un sustrato para transglutaminasa según los métodos de la presente invención. Es así un requisito que el péptido contenga un Gln o un residuo de Lys, y en particular un residuo de Gln. Si un péptido dado no es un sustrato de transglutaminasa es posible insertar uno o más residuos de Gln o Lys, y en particular Residuos de Gln en la secuencia peptídica para hacer del péptido un sustrato para transglutaminasa. En principio, tal Gln o residuo de Lys se puede insertar en cualquier posición en la secuencia, no obstante, es preferiblemente insertado en una posición dónde el fisiológico, tal como la actividad terapéutica del péptido no es afectada a un grado dónde el péptido no sea útil ya, por ejemplo en una intervención terapéutica. Inserciones de residuos de aminoácidos en péptidos se pueden causar por técnicas estándar conocidas por personas expertas en la técnica, tal como modificación postraduccional química o técnicas transgénicas.

40 [0084] Cualquier péptido que sea sustrato para transglutaminasa se puede conjugar por los métodos de la presente invención, tal como por ejemplo enzimas, hormonas peptídicas, factores de crecimiento, anticuerpos, citocinas, receptores, linfoquinas y antígenos de vacuna, y se hace una mención particular de péptidos terapéuticos, tal como insulina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2), hormona de crecimiento, citocinas, péptidos factores de trébol (TFF), modificadores receptores de melanocortina peptídica y compuestos Factor VII.

45 [0085] Insulina particularmente aplicable es insulina humana. En el presente contexto el término "insulina humana" se refiere a insulina natural o insulina producida de recombinación. Insulina humana recombinante se puede producir en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo las células huésped, pueden ser bacterianas, fúngicas (levadura inclusiva), de insecto, animal o células vegetales. Muchos compuestos de insulina han sido descritos en la bibliografía, y ellos son demasiado útiles en los métodos de la presente invención. Por "compuesto de insulina" (y expresiones

relacionadas) se entiende insulina humana en la que uno o más aminoácidos han sido eliminados y/o sustituidos por otros aminoácidos, aminoácidos inclusivos no-codificables, y/o insulina humana que comprenden aminoácidos adicionales, es decir más de 51 aminoácidos, y/o insulina humana en la que al menos un sustituyente orgánico se ata a uno o más de los aminoácidos.

5

[0086] Las siguientes documentos de patente se mencionan como descripciones de compuestos de insulina particularmente aplicables en los métodos proporcionados por la presente invención.

[0087] WO 97/31022 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina con un perfil de actividad extendida donde el grupo amino del aminoácido N-terminal de la cadena B y/o el grupo e-amino de Lys^{B29} tiene un ácido carboxílico con sustituyente lipofílico. Se hace una mención particular de insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₄ COOH)-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₆ COOH); insulina humana N^{ε129}-(CO-(CH₂)₁₈ COOH); insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₀ COOH); N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₂COOH); insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₄COOH) Asp^{B28}-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₆COOH) Asp^{B28}-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₈ COOH) Asp^{B28}-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₀COOH) Asp^{B28}-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₂COOH) Asp^{B28}-; insulina humana N^{εB30}-(CO-(CH₂)₁₄COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-; insulina humana N^{εB30}-(CO-(CH₂)₁₆COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-; insulina humana N^{εB30}-(CO-(CH₂)₁₈COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-; insulina humana N^{εB30}-(CO-(CH₂)₂₀COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-; insulina humana N^{εB30}-(CO-(CH₂)₂₂COOH) Thr^{B29}Lys^{B30}-;

15

[0088] Insulina humana N^{εB28}-(CO-(CH₂)₁₄COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-; insulina humana N^{εB28}-(CO-(CH₂)₁₆COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-; insulina humana N^{εB28}-(CO-(CH₂)₁₈COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-; insulina humana N^{εB28}-(CO-(CH₂)₂₀COOH)Lys^{B28}Pro^{B29}-; insulina humana N^{εB28}-(CO-(CH₂)₂₂COOH) Lys^{B28}Pro^{B29}-; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₄COOH) desB30; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₆COOH) desB30; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₁₈COOH) desB30; insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₀COOH) desB30; y insulina humana N^{εB29}-(CO-(CH₂)₂₂COOH) desB30.

20

[0089] WO 96/29344 (Novo Nordisk), que es incorporado aquí por referencia, divulga compuestos de insulina con un perfil de actividad extendida donde el grupo amino del aminoácido N-terminal de la cadena B tiene un sustituyente lipofílico que comprende de 12 a 40 átomos de carbono unido, o donde el grupo de ácido carboxílico del aminoácido C-terminal de la cadena B tiene un sustituyente lipofílico que comprende de 12 a 40 átomos de carbono unido.

25

[0090] WO 95/07931 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina con un perfil de actividad extendida, donde el grupo de ε-amino de Lys^{B29} tiene un sustituyente lipofílico. Se hace una mención particular de insulina humana N^{εB29}-tridecanoil des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil des(B30), insulina humana N^{εB29}-dodecanoil des(B30), insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gly^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-tetradecanoil Ala^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21} des(B30), insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-decanoil Gln^{B3} des(B30), insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Ala^{A21}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gln^{B3}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Ala^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Ala^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-tridecanoil Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-decanoil Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gln^{B3} Glu^{B30}, insulina humana N^{εB29}-Tetradecanoil Gln^{B3} Glu^{B30} y insulina humana N^{εB29}-dodecanoil Gln^{B3} Glu^{B30}.

50

55

60

[0091] WO 97/02043 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina hormonal inactiva que son útiles en el profilaxis de insulina, y en particular tales análogos de insulina humana se seleccionan de entre insulina humana desA1; insulina humana des(A1-A2); insulina humana des(A1-A3); insulina humana desA21; insulina humana des(B1-B5); insulina humana des(B1-B6); insulina humana des(B23-B30); insulina humana des(B24-B30); insulina humana des(B25-B30); insulina humana Gly^{A2}; insulina humana Ala^{A2}; insulina humana Nle^{A2}; insulina humana Thr^{A2}; insulina humana Pro^{A2};

65

insulina humana D-allo Ile^{A2}; insulina humana Nva^{A3}; insulina humana Nle^{A3}; insulina humana Leu^{A3}; insulina humana Val^{A2}, Ile^{A3}; insulina humana Abu^{A2}, Abu^{A3}; insulina humana Gly^{A2}, Gly^{A3}; insulina humana D-Cys^{A6}; insulina humana D-Cys^{A6}, D-Cys^{A11}; insulina humana Ser^{A6}, Ser^{A11} des(A8-A10); insulina humana D-Cys^{A7}; insulina humana D-Cys^{A11}; insulina humana Leu^{A19}; insulina humana Gly^{B6}; insulina humana Glu^{B12}; insulina humana Asn^{B12}; insulina humana Phe^{B12}; insulina humana D-Ala^{B12}; y insulina humana Asp^{B25} son aplicables en los métodos de la presente invención.

[0092] WO 92/15611 (Novo nordisk) divulga análogos de insulina humana con unas constantes de índice de asociación rápida en el proceso de unión al receptor de insulina y caracterizado por incluir una tirosina en la posición A13 y/o una fenilalanina, triptófano o tirosina en la posición B17. En particular, tales análogos se seleccionan de entre insulina humana Tyr^{A13}, insulina humana Phe^{B17}, insulina humana Trp^{B17}, insulina humana Tyr^{B17}, insulina humana Tyr^{A13}, Phe^{B17}, insulina humana Tyr^{A13}, Trp^{B17}, insulina humana Tyr^{A13}, Tyr^{B17}, insulina humana Phe^{A13}, Phe^{B17}, insulina humana Phe^{A13}, Trp^{B17}, insulina humana Phe^{A13}, Tyr^{B17}, insulina humana Trp^{A13}, Phe^{B17}, insulina humana Trp^{A13}, Trp^{B17} e insulina humana Trp^{A13}, Tyr^{B17}.

[0093] WO 92/00322 (Novo Nordisk), divulga análogos de insulina humana que son capaces de ser previstos a tejidos específicos, y que se caracterizan por el hecho de tener en la posición A13 y/o en la B17 en la molécula de insulina un residuo de aminoácido de origen natural diferente de leucina y/o teniendo en la posición B18 en la molécula de insulina un residuo de aminoácido de origen natural diferente de valina. En particular, tales análogos se seleccionan de entre insulina humana Ala^{B17}, insulina humana Ala^{B18}, insulina humana Asn^{A13}, insulina humana Asn^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Asn^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Asn^{A13}, Glu^{B17}, insulina humana Asn^{B18}, insulina humana Asp^{A13}, insulina humana Asp^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Asp^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Asp^{A13}, Glu^{B17}, insulina humana Asp^{B18}, insulina humana Gln^{A13}, insulina humana Gln^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Gln^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Gln^{B18}, insulina humana Glu^{A13}, insulina humana Glu^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Glu^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Glu^{A13}, Glu^{B17}, insulina humana Glu^{B18}, insulina humana Gly^{A13}, insulina humana Gly^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Gly^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Gly^{A13}, Asn^{B17}, insulina humana Gly^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Gly^{A13}, Glu^{B17}, insulina humana Gly^{B18}, insulina humana Ser^{A13}, insulina humana Ser^{A13}, Gln^{A17}, Glu^{B10}, Gln^{B17}-des(Thr^{B30}), insulina humana Ser^{A13}, Ala^{B17}, insulina humana Ser^{A13}, Asn^{B17}, insulina humana Ser^{A13}, Asp^{B17}, insulina humana Ser^{A13}, Gln^{B17}, insulina humana Ser^{A13}, Glu^{B17}, insulina humana Ser^{A13}, Thr^{B17}, insulina humana Ser^{B14}, Asp^{B17}, insulina humana Ser^{B18}, insulina humana Thr^{A13} o insulina humana Thr^{B18}.

[0094] WO 90/01038 (Novo Nordisk) divulga análogos de insulina humana con actividad biológica alta y caracterizados por el hecho de tener PheB25 sustituido por His o Tyr, tener sustituciones en una o más de las posiciones A4, A8; A17;A21, B9; B10; B12; B13; B21; B26;B27; B28 y B30, y por tener el residuo de aminoácido en la posición B30 opcionalmente ausente. En particular, tales análogos se seleccionan de entre insulina humana Tyr^{B25}, insulina humana Tyr^{B25}, Asp^{B28}, insulina humana His^{B25}, insulina humana His^{B25}, Asp^{B28}, insulina humana Tyr^{B25}-B30-amida e insulina humana His^{B25}-B30-amida.

[0095] WO 86/05496 (Nordisk Gentofte) divulga análogos de insulina humana con una acción extendida y caracterizados por el hecho de que con un grupo carboxílico B30 bloqueado, y teniendo de uno a cuatro grupos de carboxílicos bloqueados en los residuos de aminoácido a posiciones A4; A17;A21; B13 y B21. En particular, tales análogos se seleccionan de entre insulina-B30-octil éster, insulina-B30-dodecil amida, insulina-B30-hexadecil amida, insulina-(B21, B30)-dimetil éster, insulina-(B17, B30)-dimetil éster, insulina-(A4, B30) diamida, insulina-A17amida-B30-octil éster, insulina-(A4, B13)-diamida-B30-hexilamida, insulina-(A4, A17, B21, B30)-tetraamida, insulina-(A17, B30)-diamida, A4-Ala-insulina-B30-amida y B30-Leu-insulina-(A4, B30)-diamida.

[0096] WO 86/05497 (Nordisk Gentofte) divulga compuestos de insulina en el que uno o más de los cuatro residuos de aminoácidos en posiciones A4; A17; B13 y B21 comprende una cadena lateral sin carga. Se hace una mención particular de insulina humana A17-Gln, insulina humana A4-Gln, insulina porcina B21-Gln, insulina humana B13-Gln, insulina humana (A17, B21)-Gln, insulina humana A4-Ala, insulina humana B21-Thr, insulina humana B13-Val, insulina humana-Thr-A17-Gln, insulina humana B21-metil éster e insulina humana A17-metil éster.

[0097] WO 92/00321 (Novo Nordisk), divulga compuestos de insulina con actividad prolongada donde una carga positiva en el extremo N-terminal de la cadena B ha sido introducida. Se hace una mención particular de insulina humana Arg^{B5}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B5}, Pro^{B6}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B5}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B5}, Pro^{B6}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B2}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B2}, Pro^{B3}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B2}, Arg^{B3}, Ser^{A21}, insulina humana Arg^{B4}, Pro^{B5}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B4}, Arg^{B5}, Pro^{B6}, Gly^{A21}, Thr^{B30}, insulina humana Arg^{B3}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B3}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B4}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B4}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂ e insulina humana Arg^{B1}, Pro^{B2}, Gly^{A21}, Thr^{B30}-NH₂.

[0098] WO 90/07522 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina que exhiben una baja capacidad para asociar en la solución donde hay un residuo de aminoácido positivamente cargado, es decir Lys o Arg en la posición B28. Se hace una mención particular de insulina humana des[Phe^{B25}]-, insulina humana des[Tyr^{B26}]-, insulina humana des[Tyr^{B27}]-,

insulina humana des[Pro^{B28}]-, insulina porcina des[Phe^{B25}]-, insulina porcina des[Pro^{B28}]-, insulina de conejo des[Pro^{B28}]-, insulina humana des[Phe^{B25}], des[Th^{B30}]-, insulina humana des[Tyr^{B26}], des[Th^{B30}]-, insulina humana [Se^{A21}]-des[Pro^{B28}]-, insulina humana [Gly^{A21}]-des[Pro^{B28}]-, insulina humana [Gly^{A21}]-des[Phe^{B25}]-, insulina humana [Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}]-, insulina humana [His^{B25}]-des[Tyr^{B25}], des[Th^{B30}]-, insulina humana [Asn^{B25}]-des[Tyr^{B26}], des[Th^{B30}]-, insulina humana [Asp^{A21}]-des[Phe^{B25}], des[Thr^{B30}]-, insulina humana [Asp^{B28}]-des[Phe^{B25}]-, insulina humana [Asp^{B3}]-des[Phe^{B25}]-, insulina humana [Lys^{B28}]-, insulina humana [Lys^{B29}, Th^{B29}]- e insulina humana [Arg^{B28}]-des[Lys^{B29}]-.

[0099] WO 90/11290 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina con una actividad prolongada. Se hace una mención particular de [Arg^{A0}]-insulina humana-(B30-amida), [Arg^{A0}, Gln^{B13}]-insulina humana-(B30-amida), [Arg^{A0}, Gln^{A4}, Asp^{A21}]-insulina humana-(B30-amida), [Arg^{A0}, Ser^{A21}]-insulina humana-(B30-amida) e insulina humana [Arg^{A0}, Arg^{B27}]-des[Thr^{B30}]-.

[0100] WO 90/10645 (Novo Nordisk) divulga insulinas glicosiladas. Se hace una mención particular de insulina humana Phe(B1)glucosa, insulina humana Phe(B1) manosa, insulina humana Gly(A1) manosa, insulina humana Lys(B29) manosa, insulina humana Phe(B1) galactosa, insulina humana Gly(A1) galactosa, insulina humana Lys(B29) galactosa, insulina humana Phe(B1) maltosa, insulina humana Phe(B1) lactosa, insulina humana Gly(A1) glucosa, insulina humana Gly(A1) maltosa, insulina humana Gly(A1) lactosainsulina humana, Lys(B29) glucosa, insulina humana Lys(B29) maltosa, insulina humana Lys(B29) lactosa, insulina humana Gly(A1), Phe(B1) diglucosa, Gly(A1), insulina humana Lys(B29) diglucosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) diglucosa, insulina humana Phe(B1) isomaltosa, insulina humana Gly(A1) isomaltosa, insulina humana Lys(B29) isomaltosa, insulina humana Phe(B1) maltotriosa, insulina humana Gly(A1) maltotriosa, insulina humana Lys(B29) maltotriosa, insulina humana Gly(A1), Phe(B1) dimaltosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) dimaltosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) dimaltosa, insulina humana Gly(A1), Phe(B1) dilactosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) dilactosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) dilactosa, insulina humana Gly(A1), Phe(B1) dimaltotriosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) dimaltotriosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) dimaltotriosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) dimaltotriosa, insulina humana Phe(B1), Gly(A1) dimanosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) dimanosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) dimanosa, insulina humana Phe(B1), Gly(A1) digalactosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) digalactosa,

[0101] Insulina humana Gly(A1), Lys(B29) digalactosa, insulina humana Phe(B1), Gly(A1) disomaltosa, insulina humana Phe(B1), Lys(B29) disomaltosa, insulina humana Gly(A1), Lys(B29) disomaltosa, insulina humana Phe(B1) glucosa [Asp^{B10}] y Gly(A1), insulina humana Phe(B1) diglucosa [Asp^{B10}].

[0102] WO 88/065999 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina estabilizada, donde Ans21A ha sido sustituido con otros residuos de aminoácidos. Se hace una mención particular de insulina humana Gly^{A21}, insulina humana Ala^{A21}, insulina humana Ser^{A21}, insulina humana Thr^{A21} y insulina humana hSer^{A21}.

[0103] EP 254516 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina con una acción prolongada, donde residuos de aminoácidos básicos han sido sustituidos por residuos de aminoácidos neutrales. Se hace una mención particular de insulina humana Gly^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Ser^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Thr^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B20}-NH₂, insulina humana Ala^{B21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana His^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Asp^{B21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Glu^{A21}, Arg^{B21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Thr^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Ala^{B21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Asp^{B21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Gly^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Ser^{A21}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Ser^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Thr^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Ala^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, His^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Asp^{A21}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Gly^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B27}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Ser^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Thr^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, His^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Asp^{A21}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Asn^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Ser^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Thr^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Ala^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana His^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Asp^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gly^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Asn^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Ser^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Thr^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Ala^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana His^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Asp^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gly^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Asn^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Ser^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Thr^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Ala^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, His^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Asp^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Gly^{A21}, Arg^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Asn^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Ser^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Thr^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Ala^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, His^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Asp^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Gly^{A21}, Gln^{B13}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, Asn^{A21}, insulina humana Arg^{A27}, Ser^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, Thr^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, Ala^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, His^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, Asp^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Arg^{A27}, Gly^{A21}, Gln^{B13}, insulina humana Gln^{A17}, Asn^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Ser^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Thr^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Ala^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, His^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Asp^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{A17}, Gly^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{B13}, Asn^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{B13}, Ser^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana

Gln^{B13}, Thr^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{B13}, Ala^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{B13}, His^{A21}, Lys^{B27}, insulina humana Gln^{B13}, Asp^{A21}, Lys^{B27}, y insulina humana Gln^{B13}, Gly^{A21}, Lys^{B27}.

[0104] EP 214826 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina de aparición rápida.

5

[0105] EP 194864 (Novo Nordisk) divulga compuestos de insulina con una acción prolongada, donde residuos de aminoácidos básicos han sido sustituidos por residuos de aminoácidos neutrales. Se hace una mención particular de insulina humana Gln^{A17}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Gln^{B13}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Gln^{B13}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{A17}, Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Gln^{B13}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B27}, Arg^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B27}, Lys^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Lys^{B27}, Arg^{B30}-NH₂, insulina humana Lys^{B27}, Lys^{B30}-NH₂, insulina humana Lys^{B27}, Thr^{B30}-NH₂, Lys^{B29}-NH₂, insulina humana des-(B30), insulina humana Thr^{B30}-NH₂, insulina humana Lys^{B30}-NH₂, insulina humana Lys^{B30} (Lau)-NH₂, insulina humana Lys^{B30}, Arg^{B31}-NH₂, insulina humana Lys^{B30}, Lys^{B31}-NH₂, insulina humana Arg^{B30}-NH₂, insulina humana Arg^{B31}-NH₂, e insulina humana Arg^{B30}, Lys^{B31}-NH₂.

10

15

[0106] Patente US n.º. 3, 528, 960 (Eli Lilly) divulga compuestos de insulina de N-carboxiaroilo el que uno, dos o tres grupos amino primarios de la molécula de insulina tienen un grupo de carboxiaroilo.

20

[0107] Patente GB n.º. 1, 492, 997 (Nat. Res. Dev. Cuerpo.) divulga compuestos de insulina con una sustitución de carbamil a N^{εB29} con un perfil mejorado de efecto hipoglucémico.

[0108] Solicitud de patente accesible al público JP n.º. 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) divulga compuestos de insulina, donde un grupo de alcanoil se ata al grupo amino de Phe^{B1} o al grupo de ε-amino de Lys^{B29} o a ambos.

25

[0109] Solicitud de patente accesible al público JP n.º. 57-067548 (Shionogi) divulga compuestos de insulina, en el que la posición B30 tiene un aminoácido con al menos cinco átomos de carbono que no pueden necesariamente ser codificados por un triplete de nucleótidos.

30

[0110] WO 03/053339 (Eli Lilly) revelan compuestos de insulina, donde la cadena-A en el N-terminal ha sido extendida con dos residuos de aminoácidos, A-1 y A0, donde la cadena-B ha sido extendida al N-terminal con dos residuos de aminoácidos, B-1 y B0, donde los residuos de aminoácidos en posiciones B28; B29 y B39 pueden ser sustituidos, y donde el grupo de ε-amino de Lys en la posición B28 o B29 está de manera covalente atado al grupo de α-carboxil de un aminoácido cargado positivamente para formar un derivado de Lys-Nε-amino ácido. Se hace una mención particular de dichos análogos, donde A-1 y B-1 están ambos ausentes, y donde A0 representa Arg y B0 representa Arg o está ausente.

35

[0111] Compuestos de insulina seleccionados del grupo que consiste en

- i. Un análogo donde posición B28 es Asp, Lys, Leu, Val, o Ala y posición B29 es Lys o Pro; y
- ii. Insulina humana des(B28-B30), des(B27) o des(B30).

40

son también aplicables para los métodos de la presente invención, y en particular, el compuesto de insulina donde la posición B28 es Asp o Lys, y sitúan B29 es Lys o Pro. Insulina humana des(B30) es también aplicable en los métodos de la presente invención.

45

[0112] Otros compuestos de insulina aplicable son seleccionados del grupo que consisten en insulina humana B29-N^ε-miristoil-des(B30), insulina humana B29-N^ε-palmitoil-des(B30), insulina humana B29-N^ε-miristoil, insulina humana B29-N^ε-palmitoil, insulina humana B28-N^ε-miristoil Lys^{B28} Pro^{B29}, insulina humana B28-N^ε-paimitoil Lys^{B28} Pro^{B29}, insulina humana B30-N^ε-miristoil-Thr^{B29} Lys^{B30}, insulina humana B30-N^ε-palmitoil-Thr^{B29} Lys^{B30}, insulina humana B29-N^ε-(N-palmitoil-y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N^ε-(N-litocolil-y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N^ε-(ω-carboxiheptadecanoil)-des(B30), insulina humana B29-N^ε-(ω-carboxiheptadecanoil) e insulina humana B29-N^ε-miristoil-des(B30).

50

[0113] Ejemplos de GLP-1 aplicables en los métodos de la presente invención incluyen compuestos GLP-1 y GLP-1 humanos. GLP-1 humano es un péptido de residuo de aminoácido 37 originado de preproglucagón que es sintetizado. Por ejemplo, en las células L en el íleon distal, en el páncreas y en el cerebro. GLP-1 es una hormona de intestino importante con función reguladora en el metabolismo de glucosa y secreción gastrointestinal y metabolismo. Procesamiento de preproglucagón para dar GLP-1 (7-36)-amida, GLP-1 (7-37) y GLP-2 ocurre principalmente en las células L. Los fragmentos GLP-1 (7-36)-amida y GLP-1 (7-37) son ambos agentes dependientes de glucosa insulino-trópicos. En las pasadas décadas varios análogos estructurales de GLP-1 fueron aislados del veneno de las lagartijas monstruo de Gila (*Heloderma suspectum* y *Heloderma horridum*). Exendina-4 es un péptido de residuo de aminoácido 39 aislado del veneno de *Heloderma horridum*, y este péptido comparte 52% de homología con GLP-1. Exendina-4 es un potente receptor GLP-1 agonista que ha sido mostrado para estimular liberación de insulina y asegurar la disminución del nivel de glucosa en sangre cuando se ha inyectado en perros. El grupo de GLP-1 (1-37) y exendina-4(1-39) y fragmentos determinados, análogos y derivados de los mismos (designados compuestos GLP-1 aquí) son potentes agentes insulino-trópicos, y ellos son todos aplicables en el método de la presente invención.

65

Fragmentos insulínótropicos de GLP-1(1-37) son péptidos insulínótropicos para que la secuencia entera se pueda encontrar en la secuencia de GLP-1(1-37) y donde al menos un aminoácido terminal ha sido eliminado. Ejemplos de fragmentos insulínótropicos de GLP-1 (1-37) son GLP-1 (7-37) donde los residuos de aminoácidos en posiciones 1-6 de GLP-1(1-37) han sido eliminados, y GLP-1 (7-36) donde los residuos de aminoácidos en la posición 1-6 y 37 de GLP-1(1-37) han sido eliminados. Ejemplos de fragmentos insulínótropicos de exendina 4(1-39) son exendina-4(1-38) y exendina-4(1-31). La propiedad insulínótropica de un compuesto se puede determinar por in vivo o ensayos in vitro bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar para un animal y controlar la concentración de insulina en el tiempo. Análogos insulínótropicos de GLP-1(1-37) y exendina-4(1-39) se refieren a las moléculas respectivas donde uno o más de los residuos de aminoácidos han sido intercambiadas por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminadas y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido adicionados con la condición de que dicho análogo bien sea insulínótropico o sea un profármaco de un compuesto insulínótropico. Ejemplos de análogos insulínótropicos de GLP-1 (1-37) son por ejemplo Met⁸-GLP-1 (7-37) donde la alanina en la posición 8 ha sido sustituida por metionina y los residuos de aminoácidos en la posición 1 a 6 han sido eliminados, y Arg³⁴-GLP-1(7-37) donde la valina en la posición 34 ha sido sustituida con arginina y los residuos de aminoácidos en la posición 1 a 6 han sido eliminados. Un ejemplo de un insulínótropico análogo de exendina-4(1-39) es Ser² Asp³-exendina-4(1-39) donde los residuos de aminoácidos en la posición 2 y 3 han sido sustituidos con serina y ácido aspártico, respectivamente (este particular análogo también siendo conocido en la técnica como exendina-3). Derivados insulínótropicos de GLP-1 (1-37), exendina-4(1-39) y análogos de los mismos son lo que el experto en la técnica considera derivados de estos péptidos, es decir teniendo al menos un sustituyente que no esté presente en la molécula de péptido progenitor con la condición de que dicho derivado bien sea insulínótropico o sea un profármaco de un compuesto insulínótropico. Ejemplos de sustituyentes son amidas, carbohidratos, grupos alquilo y sustituyentes lipofílicos. Ejemplos de derivados insulínótropicos de GLP-1 (1-37); exendina-4(1-39) y análogos de los mismos son GLP-1 (7-36)-amida, Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) y Tyr³¹-exendina-4(1-31)-amida. Más ejemplos de GLP-1 (1-37); exendina-4(1-39), fragmentos insulínótropicos de los mismos, análogos insulínótropicos de los mismos y derivados insulínótropicos de los mismos son descritos en WO 98/08871, WO 99/43706, US 5424286 y WO 00/09666.

[0114] Los compuestos de GLP-2 y GLP-2 pueden también ser modificados por los métodos proporcionados por la presente invención. En el presente contexto un compuesto GLP-2 se enlaza con un receptor GLP-2, preferiblemente con una constante de afinidad (K_D) o una potencia (EC₅₀) por debajo de 1 μM, por ejemplo debajo de 100 nM. El término "compuesto GLP-2" se destina a indicar GLP-2 humano en el que uno o más residuos de aminoácido ha sido eliminado y/o sustituido por otro residuo de aminoácido, natural o innatural, y/o GLP-2 humano con residuos de aminoácidos adicionales, y/o GLP-2 humano en el que al menos un sustituyente orgánico se ata a uno o más de los residuos de aminoácidos. En particular, aquellos péptidos son considerados, que exposición de secuencia de aminoácido en cualquier secuencia de 33 aminoácidos consecutivo más que 60% de la secuencia de aminoácido de GLP-2 humano. También aquellos péptidos son considerados, cuya secuencia de aminoácido muestra en cualquier secuencia de 37 aminoácidos consecutivos más del 60% de la secuencia de aminoácido de GLP-2 humano, cuando hasta cuatro aminoácidos se eliminan de la secuencia de aminoácidos. También aquellos péptidos son considerados, cuya secuencia de aminoácido muestra en cualquier secuencia de 31 aminoácidos consecutivos más del 60% de la secuencia de aminoácido de GLP-2, cuando hasta dos aminoácidos se agregan para su secuencia de aminoácidos. El término "compuestos de GLP" también incluye variaciones naturales alélicas que pueden existir y ocurren de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones de postraducción pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno huésped celular.

[0115] Compuestos de GLP-2 candidatos, que se puede usar según a la presente invención incluyen los compuestos GLP-2 descritos en WO 96/32414, WO 97/39031, WO 98/03547, WO 96/29342, WO 97/31943 y WO 98/08872.

[0116] En particular, los siguientes compuestos GLP-2 son aplicables en los métodos de la presente invención. A2G-GLP-2(1-33); K30R-GLP-2(1-33); S5K-GLP-2(1-33); S7K-GLP-2(1-33); D8K-GLP-2(1-33); E9K-GLP-2(1-33); M10K-GLP-2(1-33); N11 K-GLP-2(1-33); T12K-GLP-2(1-33); I13K-GLP-2(1-33); L14K-GLP-2(1-33); D15K-GLP-2(1-33); N16K-GLP-2(1-33); L17K-GLP-2(1-33); A18K-GLP-2(1-33); D21 K-GLP-2(1-33); N24K-GLP-2(1-33); Q28K-GLP-2(1-33); S5K/K30R-GLP-2(1-33); S7K/K30R-GLP-2(1-33); D8K/K30R-GLP-2(1-33); E9K/K30R-GLP-2(1-33); M10K/K30R-GLP-2(1-33); N11K/K30R-GLP-2(1-33); T12K/K30R-GLP-2(1-33); I13K/K30R-GLP-2(1-33); L14K/K30R-GLP-2(1-33); D15K/K30R-GLP-2(1-33); N16K/K30R-GLP-2(1-33); L17K/K30R-GLP-2(1-33); A18K/K30R-GLP-2(1-33); D21K/K30R-GLP-2(1-33); N24K/K30R-GLP-2(1-33); Q28K/K30R-GLP-2(1-33); K30R/D33K-GLP-2(1-33); D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N11 K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/I13K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D21 K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N24K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y D3E/Q28K/K30R/D33E-GLP-2(1-33).

[0117] Derivados de GLP-2 con sólo un sustituyente lipofílico fijado al péptido de GLP-2 son también aplicables en los métodos de la presente invención, tal como derivados de GLP-2 donde el sustituyente lipofílico comprende de 4 a 40 átomos de carbono, tal como de 8 a 25 átomos de carbono, por ejemplo de 12 a 20 átomos de carbono.

[0118] El sustituyente lipofílico se puede unir a un residuo de aminoácido de manera que un grupo de carboxilo del

sustituyente lipofílico forme un enlace de amida con un grupo de amino del residuo de aminoácido.

[0119] Por ejemplo, el sustituyente lipofílico se fija a un residuo de Lys.

5 [0120] El sustituyente lipofílico se puede unir a un residuo de aminoácido de manera que un grupo de amino del sustituyente lipofílico forme un enlace de amida con un grupo de carboxilo del residuo de aminoácido.

10 [0121] El sustituyente lipofílico puede también ser fijado al péptido de GLP-2 mediante un separador, y dicho separador se puede seleccionar de entre β -alanina, gamma-aminobutyric acid (GABA), γ -glutamic acid, Lys, Asp, Glu, un dipéptido con Asp, un dipéptido con Glu, o un dipéptido con Lys. En una forma de realización de la invención el separador es β -alanina. Un grupo de carboxilo del péptido progenitor GLP-2 puede también formar un enlace de amida con un grupo de amino de un separador, y el grupo de carboxilo del aminoácido o separador de dipéptido forma un enlace de amida con un grupo de amino del sustituyente lipofílico.

15 [0122] Un grupo de amino del péptido progenitor de GLP-2 puede también formar un enlace de amida con un grupo de carboxílico de un separador, y un grupo de amino del separador forma un enlace de amida con un grupo de carboxilo del sustituyente lipofílico.

20 [0123] En una forma de realización de la invención el sustituyente lipofílico es un grupo de cadena lineal o ramificado de alquilo. En una forma de realización de la invención el sustituyente lipofílico es el grupo de acilo de un ácido graso de cadena lineal o ramificado.

[0124] En una forma de realización de la invención el sustituyente lipofílico es un grupo de cadena de alcano α lineal o ramificado, ácido ω -dicarboxílico.

25 [0125] En una forma de realización de la invención el derivado de GLP-2 tiene un sustituyente lipofílico. En una forma de realización de la invención el derivado de GLP-2 tiene dos sustituyentes lipofílicos. En una forma de realización de la invención el derivado de GLP-2 tiene tres sustituyentes lipofílicos. En una forma de realización de la invención el derivado de GLP-2 tiene cuatro sustituyentes lipofílicos.

30 [0126] La siguiente lista contiene derivados de GLP-2 que son particularmente aplicables en los métodos de la presente invención.

S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 35 D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 40 I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N 16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(octanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 45 L17K(3-(nonanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(decanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(undecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 50 L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 55 L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 60 L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 65 L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);

- L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((SF4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 5 L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 10 L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 15 L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 D21K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 20 Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 25 M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 30 D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 N 16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 35 L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 40 L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 45 L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 50 L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 55 L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 60 L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 65 L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);

- L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
 5 A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 D21 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 D3E/S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 10 D3E/S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 15 D3E/T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 20 D3E/L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 25 D3E/L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 30 D3E/L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 35 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 40 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 45 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 50 D3E/L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 55 D3E/L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 60 D3E/D21 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
 D3E/N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y
 D3E/Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33).

65 [0127] Compuestos de Factor VII aplicable en los métodos de la presente invención comprenden Factor VII de tipo salvaje (es decir, un polipéptido con la secuencia de aminoácido descrita en la patente US n.º 4, 784, 950), al igual que variantes de Factor VII exhibiendo sustancialmente la misma o una mejorada actividad biológica en relación a Factor VII

de tipo salvaje, polipéptidos relacionados con Factor VII al igual que derivados de Factor VII y conjugados de Factor VII. El término "componentes de Factor VII" se destina a abarcar polipéptidos de Factor VII en su forma no dividida (zimógeno), al igual que aquellos que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas respectivas bioactivas, que puede ser designados Factor VIIa. Típicamente, Factor VII es dividido entre los residuos 152 y 153 para producir Factor VIIa. Tales variantes de Factor VII pueden mostrar propiedades diferentes en relación al Factor VII humano, estabilidad inclusiva, unión de fosfolípido, actividad específica alterada y similares.

[0128] Como se utiliza en este caso "polipéptidos relacionados con Factor VII" comprende polipéptidos, incluyendo variantes, en las que la actividad biológica de Factor VIIa ha sido sustancialmente modificada o reducida relativamente a la actividad de Factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, Factor VII o Factor VIIa en que alteraciones de secuencia de aminoácidos específicas han sido introducidas que modifican o disgregan la bioactividad del polipéptido.

[0129] El término "derivado de Factor VII" como se utiliza en este caso, se destina a designar Factor VII de tipo salvaje, variantes de Factor VII que muestran sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación a Factor VII de tipo salvaje y polipéptidos relacionados de Factor VII, en los que uno o más de los aminoácidos del péptido progenitor han sido químicamente modificados, por ejemplo por alquilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar. Esto incluye pero de forma no limitativa Factor VIIa humano PEGilado, Factor VIIa humano de cisteína PEGilado y variantes de los mismos.

[0130] El término "Factor VIIa humano PEGilado" significa Factor VIIa humano, con una molécula PEG conjugada a un polipéptido de Factor VIIa humano. Debe entenderse que la molécula de PEG se puede unir a cualquier parte del polipéptido de Factor VIIa, incluido cualquier residuo de aminoácido o fracción de carbohidrato del polipéptido de Factor VIIa. El término "Factor VIIa humano cistein-PEGilado" significa Factor VIIa con una molécula de PEG conjugada a un grupo de sulfhidril de una cisteína introducida en el Factor VIIa humano.

[0131] La actividad biológica de Factor VIIa en la coagulación de sangre deriva de su capacidad para (i) enlazar con factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica de factor IXa o Factor X para producir Factor activado IX o X (Factor IXa o Xa, respectivamente). Para fines de la invención, actividad biológica de Factor VIIa se puede cuantificar por medición de la capacidad de una preparación para promover coagulación de sangre usando plasma deficiente en Factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente EEUU n°. 5, 997, 864. En este ensayo, actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación en relación a una muestra de control y se convierte en "unidades de Factor VII" por comparación con un suero humano agrupado estándar con 1 unidad/ml actividad de Factor VII. Alternativamente, actividad biológica de Factor VIIa se puede cuantificar por medición de (i) la capacidad de Factor VIIa para producir Factor Xa en un sistema que comprende TF introducido en una membrana lipídica y Factor X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) medición de la hidrólisis de Factor X en un sistema acuoso; (iii) medición de su unión física para TF usando un instrumento basado en la resonancia de plasmón de superficie (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997) y medición de (iv) hidrólisis de un sustrato sintético.

[0132] Variantes del Factor VII con sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación a Factor VIIa de tipo salvaje abarcan aquellas que exponen como mínimo aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75% y de la forma más preferible al menos aproximadamente 90% de la actividad específica de Factor VIIa que ha sido producida en el mismo tipo celular, cuando evaluado en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de enlace de TF como se ha descrito anteriormente. Variantes del Factor VII con actividad biológica sustancialmente reducida en relación a Factor VIIa de tipo salvaje son aquellas que exponen menos que aproximadamente 25%, preferiblemente menos que aproximadamente 10%, más preferiblemente menos que aproximadamente 5% y de la forma más preferible menos que aproximadamente 1% de la actividad específica de Factor VIIa de tipo salvaje que ha sido producidos en el mismo tipo celular cuando evaluado en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de enlace de TF como se ha descrito anteriormente. Variantes del Factor VII con una actividad biológica sustancialmente modificada en relación a Factor VII de tipo salvaje incluyen, sin limitación, variantes del Factor VII que muestran actividad proteolítica de Factor X independiente de TF y aquellas que enlazan TF pero no disocian Factor X.

[0133] Variantes de Factor VII, que muestra sustancialmente la misma o mejor bioactividad que Factor VII de tipo salvaje, o, alternativamente, muestran bioactividad reducida o sustancialmente modificada en relación a Factor VII de tipo salvaje, incluyen sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de Factor VII de tipo salvaje por inserción, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos.

[0134] Los términos "variante" o "variantes", como se utilizan en este caso, se destinan a designar Factor VII con la secuencia de Factor VII de tipo salvaje, donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido sustituidos por otro aminoácido y/o donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido eliminados y/o donde uno o más aminoácidos han sido insertados en la proteína y/o donde uno o más aminoácidos han sido añadidos a la proteína progenitora. Tal adición puede tener lugar bien al final de N-terminal o al final de C-terminal de la proteína progenitora o ambos. La "variante" o "variantes" dentro de esta definición todavía tienen actividad de FVII en su forma activada. En una forma de realización una variante es 70 % idéntica a la secuencia de Factor VII de tipo salvaje. En una forma de realización una variante es 80 % idéntica a la secuencia de Factor VII de tipo salvaje. En otra forma de realización una

5 F374YN158D/M298Q-FVII, F374YN158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII,
 F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/N158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305VN158D/E296V-FVII,
 F374Y/L305V/B158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/E296VN158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/N158D-FVII,
 F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,
 10 F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374YN158T/S314E/E296V-FVII,
 F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII,
 15 F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374YN158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305VN158D/M298Q/K337A-FVII,
 20 F374Y/L305VN158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305VN158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305VN158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305VN158T/M298Q/K337A-FVII,
 25 F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305VN158T/E296V/S314E-
 FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305VN158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305VN158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 30 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 S52A-Factor VII, factor de S60A VII; factor de R152E VII, factor de S344A VII, Factor VIIa que care el dominio Gla; y
 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315NN317T-FVII,
 K143N/N145T/R315NN317T-FVII; y FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos
 de 233Tr a 240Asn, FVII teniendo sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a
 35 329Cys.

[0139] Hormona de crecimiento (GH) aplicable en los métodos de la presente invención incluye hormona de crecimiento
 humana (hGH), esta secuencia y características son fijadas en, por ejemplo fármacos de hormona, Gueriguian, U.S.P.
 Covention, Rockvill, 1982 y compuestos de hormona de crecimiento. El término "compuesto de hormona de crecimiento"
 40 se destina a indicar hormona de crecimiento humana (hGH) en la que uno o más residuos de aminoácidos han sido
 eliminados y/o sustituidos por otros residuos de aminoácidos, naturales o innaturales, y/o hGH comprendiendo residuos
 de aminoácidos de adición, natural o innatural, y/o hGH en el que al menos un sustituyente orgánico se ata a uno o más
 sustituyentes orgánicos. Se hace una mención particular de la secuencia de aminoácidos nativa 191 (somatropin) y las
 45 especies de metionina de n-terminal de aminoácido 192 (somatrem).

[0140] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicables en la presente invención incluyen donde
 aminoácido nº 172, 174, 176 y 178 como un grupo se sustituye por uno de los grupos siguientes de aminoácidos (R, S,
 F, R); (R, un, Y, R), (K, T, Y, K); (R, S, Y, R); (K, A, Y, R); (R, F, F, R); (K, Q, Y, R); (R, T, Y, H); (Q, R, Y, R); (K, K, Y,
 K); (R, S, F, S) o (K, S, N, R) como descrito en WO 92/09690 (Genentech).
 50

[0141] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicable en la presente invención incluyen hGH con
 las sustituciones siguientes G120R, G120K, G120Y, G120F y G120E, como descritos en US 6, 004931 (Genentech).

[0142] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicable en la presente invención incluyen hGH con el
 conjunto siguiente de sustituciones R167N, D171S, E174S, F176Y y I179T; R176E, D171S, E174S y F176Y; F10A,
 55 M14W, H18D y H21N; F10A, M14W, H18D, H21N, R167N, D171S, E174S, F176Y, I179T; F10A, M14W, H18D, H21N,
 R167N, D171A, E174S, F176Y, I179T; F10H, M14G, H18N y H21N; F10A, M14W, H18D, H21N, R167N, D171A, T175T
 y I179T; y F101; M14Q, H18E, R167N, D171S y I179T, como descritos en US 6,143, 523 (Genentech).

[0143] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicable en la presente invención incluyen hGH con el
 conjunto siguiente de sustituciones H18A, Q22A, F25A, D26A, Q29A, E65A, K168A, E174A y G120K como descritos en
 60 US 6,136, 536 (Genentech).

[0144] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicable en la presente invención incluyen hGH con el
 conjunto siguiente de sustituciones H18D, H21 N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y donde G120 es
 65 posteriormente sustituido con bien R, K, W, Y, F o E, como descrito en US 6, 057,292 (Genentech).

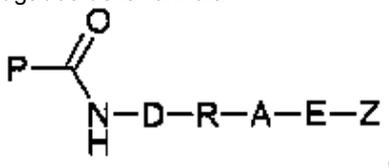
- 5 [0145] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicables en la presente invención incluyen hGH con el conjunto siguiente de sustituciones H18D, H21 N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S y I179T, como descritos en US 5, 849, 535 (Genentech).
- [0146] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicable en la presente invención incluyen hGH con el conjunto siguiente de sustituciones H18D, H21 D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S y I179T; y H18A, Q22A, F25A, D26A, Q29A, E65A, K168A y E174A, como descritos en WO 97/11178 (Genentech).
- 10 [0147] Otros ejemplos de compuesto de hormona de crecimiento aplicables en la presente invención incluyen hGH con el siguiente conjunto de sustituciones K168A y E174A; R178N y I179M; K172A y F176A; y H54F, S56E, L58I, E62S, D63N y Q66E como descritos en WO 90/04788 (Genentech).
- 15 [0148] Ejemplos de citocinas que podrían ser modificadas usando el método de la presente invención incluyen eritropoyetina (EPO), trombopoyetina, INF- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , interleukin-1 β (IL-1- β), IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21 IL-24, factor que estimula la colonia de granulita (G-CSF), GM-CSF, y quimiocinas tal como proteína-1 inflamatoria macrófaga (MIP-1) proteína inducible de interferón gamma y monoquinas inducido por IFN γ (MIG).
- 20 [0149] Ejemplos particulares de IL-19 aplicables en los métodos de la presente invención incluyen aquellos descritos WO 98/08870 (ciencia de genoma humano), . Se hace una mención particular del péptido descrito como SEQ ID NO:2 in WO 98/08870.
- 25 [0150] Ejemplos Particulares de aplicable IL-20 incluyen aquellos descritos en WO 99/27103 (Zimogenetics). En el presente contexto, IL-20 se destina a indicar IL-20 mismo y fragmentos de los mismos al igual que polipéptidos que son al menos 90% idénticos para IL-20 o fragmentos de los mismos. Proteínas particular aplicable en los métodos de la presente invención incluyen aquellas descritas en WO 99/27103 como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 y SEQ ID NO:35.
- 30 [0151] Ejemplos de IL-21 aplicables en los métodos de la presente invención incluyen aquellos descritos en WO 00/53761 (Zimogenetics). Se hace una mención particular del péptido descrito como SEQ ID NO:2 en WO 00/53761.
- 35 [0152] TTF son aplicables en los métodos de la presente invención. Péptidos de TTF son una familia de péptidos encontrados principalmente en la asociación con el tracto gastrointestinal. Se hace una mención particular del péptido pS2 asociado al cáncer de pecho (TFF-1), que se conoce de polipéptido de espasmolítico de humano, ratón, y rata, (TFF-2), que se conoce de humano, cerdo, rata, y ratón y factor de trébol intestinal (TFF-3), conocido de humano, rata y ratón.
- 40 [0153] Otros péptidos de la familia del TFF aplicables en los métodos de la presente invención incluyen aquellos descritos en WO 02/46226 (Novo Nordisk), que es incluido aquí por referencia. Se hace una mención particular de un péptido TFF-2 donde un péptido TFF2 con un aminoácido como descrito en SEQ ID NO:1 de WO 02/46226 que comprende enlaces de disulfuro entre Cys6-Cys104; Cys8-Cys35; Cys19-Cys34; Cys29-Cys46; Cys58-Cys84; Cys68-Cys83, y Cys78-Cys95 y donde una fracción X independientemente seleccionada de residuos de azúcar y oligosacáridos es unido de manera covalente a Asn15.
- 45 [0154] Otros péptidos de la familia de TFF incluyen TFF-1 y TFF-3 dimeros como aquellos descritos en WO 96/06861 (Novo Nordisk).
- 50 [0155] Diferentes receptores de melanorcortina son conocidos, y se mencionan en particular péptidos aplicables para los métodos de la presente invención es hecha de agonistas receptores de péptido melanocortin-4, que se conocen por tener un efecto supresor de apetito. Se hace una mención particular de péptidos o proteínas descritos en los siguientes documentos de patente, : US 6, 054, 556 (Hruby), WO 00/05263 (William Harvey Research), WO 00/35952 (Melacure), WO 00/35952 (Melacure), WO 00/58361 (Procter & Gamble), WO 01/52880 (Merck), WO 02/26774 (Procter & Gamble), WO 03/06620 (Palatin), WO 98/27113 (Rudolf Magnus Institute) y WO 99/21571 (Trega).
- 55 [0156] Otras clases de péptidos o proteínas que son aplicables en los métodos de la presente invención incluyen enzimas. Muchas enzimas se usan para varios fines industriales, y se hace una mención particular de hidrolasas (proteasas, lipasas, celulasas, esterases), oxidorreductasas (lacasas, peroxidasas, catalasas, dismutasas de superóxido, lipoxigenasas), transferasas e isomerasas.
- 60 [0157] Otros péptidos o proteínas aplicables en los métodos de la presente invención incluyen ACTH, factor de
- 65

liberación de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina y fragmentos y sus análogos, glucagón, IGF-1, IGF-2, enterogastrina, gastrina, tetragastrin, pentagastrina, urogastrin, factor de crecimiento epidérmico, secretina, factor de crecimiento de nervio, hormona de liberación de tiotropina, somatostatina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotalámica, prolactina, hormonas estimuladoras de la tiroides, endorfinas, enkefalinas, vasopresina, oxitocina, opiodes y sus análogos, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina-desaminasa y ribonucleasa.

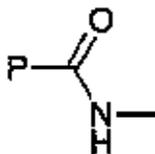
[0158] Péptidos a ser modificados según los métodos de la presente invención pueden bien ser aislados de fuentes naturales (p. ej. plantas, animales o microorganismos, tal como levadura, bacterias, hongos o vira) o ellos puede ser sintetizados. Péptidos de fuentes naturales también incluyen péptidos de fuentes transgénicas, por ejemplo fuentes que han sido genéticamente modificadas para expresar o para aumentar la expresión de un péptido, donde dicho péptido puede ser "natural" en el sentido que éste existe en la naturaleza o "innatural" en el sentido que éste sólo existe debido a intervención humana. Fuentes naturales de forma aislada de péptidos puede también ser sometidos a modificación sintética antes de la conjugación de la presente invención.

[0159] En una forma de realización, la aplicación divulga péptidos conjugados obtenidos según los métodos de la presente invención. Si el péptido conjugado obtenido por los métodos de la presente invención es un péptido terapéutico, la aplicación también proporciona el uso de tales compuestos en la terapia, y composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos.

[0160] La aplicación divulga péptidos conjugados de la fórmula



donde P, R, A, D, E y Z son tal como se ha definido anteriormente, y donde el grupo



representa un radical peptídico obtenido eliminando un hidrógeno de-NH₂ en la cadena lateral de un residuo de Gln, y sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de las mismas.

[0161] Como se ha mencionado anteriormente, un péptido puede contener más de un residuo de Gln dónde el péptido puede ser conjugado. En este caso, la fórmula anterior está destinada también a indicar un péptido que ha sido conjugado en más de un sitio.

[0162] En tanto en cuanto el péptido no conjugado (P-C(O)-NH₂) es un péptido terapéutico, la invención también se refiere al uso de la terapia I de los péptidos conjugados, y en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos conjugados.

[0163] Insulina se utiliza para tratar o prevenir diabetes, y en una forma de realización, la presente invención así proporciona un método de tratamiento de diabetes tipo 1 o tipo 2, el método que comprende administración a un sujeto con la necesidad de una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina o compuesto de insulina conjugado según la presente invención.

[0164] En otra forma de realización, la aplicación proporciona el uso de una insulina o compuesto de insulina conjugado según la presente invención en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de diabetes de tipo 1 o tipo 2.

[0165] GLP-1 se puede utilizar en el tratamiento de hiperglicemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, apoptosis de β-célula, deficiencia de β-célula, enfermedad inflamatoria intestinal, dispepsia, trastornos cognitivos, por ejemplo aumento cognitivo, neuroprotección, aterosclerosis, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares. En una forma de realización, la presente aplicación así proporciona un método de tratamiento de dicha enfermedades, el método que comprende administración a un sujeto con la necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de GLP-1 o de un compuesto de GLP-1 conjugado según la presente invención.

[0166] En otra forma de realización, la aplicación proporciona el uso de un GLP-1 o compuesto de GLP-1 conjugado según la presente invención en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas.

[0167] GLP-2 se puede utilizar en el tratamiento de fallo intestinal conduciendo a malabsorción de nutrientes en los intestinos, y en particular GLP-2 se puede utilizar en el tratamiento de síndrome de intestino pequeño, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohns, colitis de colágeno inclusivo de colitis, colitis de radiación, atrofia de post radiación, esprue no tropical (intolerancia de gluten) y tropical, tejido dañado después de obstrucción vascular o traumatismo, diarrea turística, deshidratación, bacteriemia, sepsis, anorexia, tejido nervioso dañado después de quimioterapia, bebés prematuros, esclerodermia, gastritis inclusiva gastritis atrófica, gastritis atrófica de postantrectomía y gastritis de pilori de helicobacteria, úlceras, enteritis, cul-de-sac, obstrucción linfática, enfermedad vascular e injerto-contra-huésped, curación después de procedimientos quirúrgicos, atrofia de post radiación y quimioterapia, y osteoporosis. Es por lo tanto una intención de la presente aplicación proporcionar métodos de tratamiento de la enfermedades anteriores, el método que comprende administración a un sujeto con la necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un GLP-2 o compuesto de GLP-2 conjugado según esta invención.

[0168] En otra forma de realización, la presente aplicación proporciona el uso de un GLP-2 o compuesto de GLP-2 conjugado según esta invención en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas.

[0169] Hormona de crecimiento se puede utilizar en el tratamiento de deficiencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de girador; síndrome Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad crónica renal, artritis juvenil reumatoide; fibrosis quística, infección de VIH en niños recibiendo tratamiento HAART (niños VIH/HALS); niños pequeños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); estatura corta en niños nacidos con peso de nacimiento muy bajo (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura idiopática corta (ISS); GHD en adultos; fractura en o de huesos largos, tal como tibia, fíbula, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarsio, y dígito; fracturas en o de huesos esponjosos, tal como la espadilla, base de mano, y base de pie; pacientes después cirugía de tendón o de ligamento en por ejemplo mano, rodilla, u hombro; pacientes con o entrando en osteogénesis de distracción; pacientes después de sustitución de cadera o de disco, reparación de menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, tal como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en que material de osteosíntesis, tal como uñas, tornillos y placas, han sido fijados; pacientes con mal-unión o no unión de fracturas; pacientes después osteotomía, por ejemplo de tibia o primer dedo; pacientes después de implantación de injerto; degeneración de cartilago articular en la rodilla provocado por traumatismo o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en la diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a malnutrición en APCD; inversión de caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar de obstructivo crónico en APCD; VIH en APCD; persona mayor con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función de hígado perjudicado; varones con infecciones VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociada a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después cirugía mayor electiva, detoxificación alcohólico/fármaca o traumatismo neurológico; envejecimiento; frágil mayor; osteo-artritis; cartilago traumáticamente dañado; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; daño cerebral traumático; hemorragia subaracnoidea; peso de nacimiento muy bajo; síndrome metabólico; miopatía de glucocorticoide; o estatura corta debido a tratamiento de glucocorticoide en niños. Hormonas de crecimiento también han sido usadas para aceleración de la curación de tejido muscular, tejido nervioso o lesiones; la aceleración o mejora de flujo de sangre para tejido dañado; o la reducción de índice de infección en el tejido dañado, el método que comprende administración a un paciente en la necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I. La presente aplicación así proporciona un método para tratar estas enfermedades o estados, el método que comprende administración a un paciente en la necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona de crecimiento o compuesto de hormona de crecimiento conjugado según la presente invención.

[0170] Típicamente, la cantidad de hormona de crecimiento conjugado administrado está en el intervalo de 10^{-7} - 10^{-3} g/kg del peso corporal, tal como 10^{-6} - 10^{-4} g/kg del peso corporal, tal como 10^{-5} - 10^{-4} g/kg del peso corporal.

[0171] En otra forma de realización, la aplicación proporciona el uso de una hormona de crecimiento o compuesto de hormona de crecimiento conjugado en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas o estados.

[0172] Citocinas se implican en la etiología de un huésped de enfermedades implicando el sistema inmunológico. En particular se menciona que IL-20 podría estar implicado en la psoriasis y su tratamiento, y I-21 se implica en cáncer y podrían constituir un tratamiento para esta enfermedad. En una forma de realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de psoriasis comprendiendo la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un IL-20 conjugado según la presente invención. En otra forma de realización, la invención se refiere al uso de un IL-20 conjugado de la presente invención en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de psoriasis.

[0173] En otra forma de realización, la presente aplicación se refiere a un método de tratamiento de cáncer, el método que comprende administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un IL-21 conjugado de la presente invención a un sujeto con la necesidad del mismo.

[0174] En otra forma de realización, la aplicación se refiere al uso de un IL-21 conjugado según la presente invención en

la producción de un medicamento usado en el tratamiento contra el cáncer.

5 [0175] Péptidos de TTF se pueden utilizar para aumentar la viscosidad de estratos de muscus en el sujeto, para reducir secreción de salvia, por ejemplo dónde la secreción de salvia en aumento se provoca por terapia de irradiación, tratamiento con síndrome del Sjögren o anticolinérgicos, para tratar rinitis alérgica, úlceras inducidas gástricas de estrés secundario a traumatismo, impacto, operaciones grandes, renal o enfermedades de hígado, tratamiento con NSAID, por ejemplo aspirina, esteroides o alcohol. Péptidos de TTF pueden también ser usados para tratar enfermedad de Chrohn, colitis ulcerosa, queratoconjuntivitis, infecciones de vejiga crónica, cistitis intestinal, papilomas y cáncer de vejiga. En una forma de realización, la invención así se refiere a un método de tratamiento de la enfermedades o estados de
10 mención anterior, el método que comprende administración a un paciente sujeto en la necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un TTF conjugado según la presente invención.

15 [0176] En otra forma de realización, la aplicación se refiere el uso de un TTF conjugado de la presente invención en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas o estados.

20 [0177] Modificadores receptores de melanocortina, y en particular agonistas receptores de melanocortina 4 han sido implicadas en el tratamiento y prevención de obesidad y enfermedades relacionadas. En una forma de realización, la presente aplicación proporciona un método para evitar o demorar la progresión de tolerancia a la glucosa perjudicada (IGT) a diabetes tipo 2 no insulino dependiente, para evitar o demorar la progresión de diabetes tipo 2 no insulino dependiente a diabetes insulino dependiente, para tratar obesidad y para la regulación del apetito. Agonistas de receptores de melanocortina 4 también han sido implicados en el tratamiento de enfermedades seleccionadas de aterosclerosis, hipertensión, diabetes, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa (IGT), dislipidemia, cardiopatía coronaria, enfermedad de vesícula biliar, cálculo, osteoartritis, cáncer, disfunción sexual y el riesgo de muerte prematura. En una forma de realización, la aplicación así proporciona un método de tratamiento de la enfermedades
25 anteriores o estados, el método que comprende administración a un sujeto con la necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista receptor de melanocortina 4 conjugado de la presente invención.

30 [0178] En todavía otra forma de realización, la aplicación se refiere al uso de un agonista receptor de melanocortina 4 conjugado de la presente invención en la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas o estados.

35 [0179] Compuestos de Factor VII han sido implicados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con coagulación, y compuestos de Factor VII biológicamente activos en particular ha sido implicados en el tratamiento de hemofílicos, hemofílicos con inhibidores para Factor VIII y IX, pacientes con trombocitopenia, pacientes con trombocitopatías, tal como defecto de liberación de plaquetas de trombocitopenia de Glanzmann y defectos de agrupación de almacenamiento, paciente con enfermedad de von Willebrand, pacientes con enfermedad hepática y problemas de sangrado asociado a traumas o cirugía. Compuestos de Factor VII biológicamente inactivos han sido implicados en el tratamiento de pacientes que están en estados hipercoagulables, tal como pacientes con sepsis, trombotosis de vena profunda, pacientes en el riesgo de infecciones de miocardio o derrame cerebral trombótico, embolia pulmonar, pacientes con
40 síndromes agudos coronarias, pacientes experimentando cardiopatía coronaria, prevención de eventos cardíacos y restenosis para pacientes recibiendo angioplastia, pacientes con enfermedades periférica vascular y síndrome de angustia aguda respiratoria. En una forma de realización, la invención así proporciona un método para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas o estados, el método que comprende administración a un sujeto con la necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Factor VII conjugado según la presente invención.
45

50 [0180] En otra forma de realización, la aplicación proporciona el uso de un compuesto de Factor VII conjugado según la presente invención en la producción de un medicamento usado en el tratamiento de la enfermedades anteriormente mencionadas o estados.

55 [0181] Muchas enfermedades son tratadas usando más de un medicamento en el tratamiento, bien concomitantemente administrado o consecutivamente administrado. Está por lo tanto dentro del campo de la presente aplicación para usar los conjugados peptídicos de la presente invención en métodos terapéuticos para el tratamiento de una de la enfermedades anteriormente mencionadas en combinación con uno o más de los otros compuestos terapéuticamente activos normalmente usados en el tratamiento de dicha enfermedad. Por analogía, está también dentro del campo de la presente aplicación para usar los conjugados peptídicos de la presente invención en combinación con otros compuestos terapéuticamente activos normalmente usados en el tratamiento de una de la enfermedades anteriormente mencionadas en la producción de un medicamento para dicha enfermedad.

60 [0182] Como se ha mencionado anteriormente, péptidos terapéuticos conjugados según los métodos de la presente invención se pueden utilizar en la terapia.

65 [0183] En otra forma de realización, la presente aplicación proporciona el uso de péptidos conjugados de la presente invención en diagnósticos.

Composiciones farmacéuticas

[0184] Otro fin es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un péptido conjugado, tal como hormona de crecimiento conjugada (GH) de la presente invención que está presente en una concentración de 10-15 mg/ml a 200 mg/ml, tal como por ejemplo 10-10 mg/ml a 5 mg/ml y donde dicha composición tiene un pH de 2,0 a 10,0. La composición puede comprender además un sistema de tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) de quelante, estabilizadores y tensioactivos. En una forma de realización de la invención la composición farmacéutica es una composición acuosa, es decir composición que comprende agua. Tal composición es típicamente una solución o una suspensión. En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica es una solución acuosa. El término "composición acuosa" se define como una composición que comprende al menos 50 % p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % en peso de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % en peso de agua.

[0185] En otra forma de realización la composición farmacéutica es una composición liofilizada, a lo cual el médico o el paciente adiciona solventes y/o diluyentes antes de uso.

[0186] En otra forma de realización la composición farmacéutica es una composición seca (p. ej. de pulverización o liofilizada seco) preparada para uso sin alguna disolución previa.

[0187] En otro aspecto la aplicación se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo una solución acuosa de un péptido conjugado, tal como por ejemplo un GH conjugado, y un tampón, donde dicho péptido conjugado, tal como por ejemplo GH conjugado está presente en una concentración de 0,1-100 mg/ml o por encima, y donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 2, 0 a aproximadamente 10, 0.

[0188] En una otra forma de realización de la aplicación el pH de la composición se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0.

[0189] En otra forma de realización de la aplicación el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas derivadas. Cada uno de estos tampones específicos constituyen una forma de realización alternativa de la aplicación.

[0190] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un conservante aceptable farmacéuticamente. En otra forma de realización de la aplicación el conservante es seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato metílico, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, hidroxibenzoato de P de butilo, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato etilo, bencetonio, cloruro clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1, 2-diol) o mezclas derivadas. En otra forma de realización de la aplicación el conservante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el conservante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el conservante es presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el conservante es presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la aplicación. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido al experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

[0191] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un agente isotónico. En otra forma de realización de la aplicación el agente isotónico es seleccionado del grupo que consiste de una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. l-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanediol (propilenglicol), 1,3-propanediol, 1,3-butanediol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluso por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na puede ser utilizada. En una forma de realización el aditivo de azúcar es sacarosa. Alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo-OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una forma de realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Se pueden utilizar los azúcares o polialcoholes mencionados arriba individualmente o en la combinación. No hay límite fijo de la cantidad usada, puesto que azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no tiene un efecto adverso en los efectos estabilizantes obtenidos usando los métodos de la aplicación. En una forma de realización, la concentración de azúcar o de azúcar alcohólica está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra forma de realización del agente isotónico de aplicación está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el agente isotónico está presente en una concentración de 8

mg/ml a 24 mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes específicos isotónicos constituye una forma de realización alternativa de la aplicación. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

[0192] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un agente quelante. En otra forma de realización de la aplicación el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y sus mezclas derivadas. En otra forma de realización de la aplicación el agente quelante es presente en una concentración de 0,1mg/ml a 5mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el agente quelante es presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2mg/ml. En otra forma de realización de la aplicación el agente quelante es presente en una concentración de 2mg/ml a 5mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la aplicación. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

[0193] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

[0194] Más particularmente, composiciones de la aplicación son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen una proteína que posiblemente muestren formación agregada durante almacenamiento en composiciones farmacéuticas líquidas. Por "formación agregada" se entiende una interacción física entre las moléculas de proteína que da como resultado formación de oligómeros, que puedan permanecer solubles o ser grandes visibles agregados que se precipiten de la solución. Por "durante almacenamiento" se pretende que una composición líquida farmacéutica o composición una vez preparada, no sea inmediatamente administrada a un sujeto. Más bien, tras la preparación, se empaqueta para almacenamiento, bien en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para más tarde reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un sujeto. Por "forma seca" se pretende que la composición líquida farmacéutica o composición se seque bien por secado de congelación (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams and Polli (1984) J Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (ver Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; and Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), or air drying (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; and Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). Formación agregada por una proteína durante almacenamiento de una composición líquida farmacéutica puede contrariamente afectar la actividad biológica de esta proteína, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, formación agregada puede causar otros problemas tal como bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica con proteínas es administrada usando un sistema de infusión.

[0195] Las composiciones farmacéuticas de la aplicación pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para reducir formación agregada por la proteína durante almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado esté presente bien en su forma de base libre o en su forma de sal. Donde una combinación de aminoácidos se usan, todos los aminoácidos puede estar presentes en sus formas de base libre, todos puede estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras otros están presentes en sus formas de sal. En una forma de realización, aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos llevando una cadena lateral cargada tal como arginina, lisina, ácido aspártico, y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L o D isómero, o mezclas derivadas) de un aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas derivadas) o combinaciones de estos estereoisómeros o glicina o una base orgánica tal como pero no limitado a imidazol, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la aplicación mientras el aminoácido particular o base orgánica está presente bien en su forma de base libre o su forma de sal. En una forma de realización el L-estereoisómero de un aminoácido se usa. En una forma de realización el L-estereoisómero se usa. Composiciones de la aplicación puede también ser formuladas con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que aporta el efecto deseado de disminución de formación agregada por la proteína durante almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la aplicación. Análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y arginina L de n-monoetil, análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones bien en su forma de base libre o su forma de sal. En otra forma de realización de la aplicación los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

[0196] En otra forma de realización de la metionina de aplicación (u otros aminoácidos sulfúricos o aminoácidos análogos) se puede adicionar para inhibir oxidación de residuos de metionina para sulfóxido de metionina cuando la proteína que actúa como el agente terapéutico es una proteína que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies de metionina oxidada en el

tiempo. La inhibición de oxidación de metionina produce retención superior de la proteína en su forma apropiada molecular. Cualquier estereoisómero de metionina (isómero L o D) o cualquier combinación de las mismas se puede usar. La cantidad a ser adicionada debería ser una cantidad suficiente para inhibir oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede obtener por metionina de adición tal que la proporción de metionina adicionada a gamas de residuos de metionina de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

[0197] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos bajos moleculares. En otra forma de realización de la aplicación el estabilizador se selecciona de glicol de polietileno (p. ej. PEG 3350), alcohol de polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de los mismos (p. ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias con azufre como monioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol y diferentes sales (p. ej. sodio cloruro). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0198] Las composiciones farmacéuticas puede también comprender agentes adicionales estabilizantes, que además mejoran estabilidad de una proteína terapéuticamente activa en esta. Agentes estabilizantes de interés particular a la actual aplicación incluyen, pero de forma no limitativa, metionina y EDTA, que protegen la proteína contra la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege la proteína contra la agregación asociada con congelación-descongelación o corte mecánico.

[0199] En otra forma de realización de la aplicación la composición comprende además un tensioactivo. En otra forma de realización de la aplicación el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros de bloque de polioxietileno de polioxipropileno (por ejemplo, poloxámeros tal como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, polioxietileno y derivados de polietileno tal como derivados alcoxilados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20; Tween-40; Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, serina de fosfatidilo, colina de fosfatidilo, etanolamina de fosfatidilo, inositol de fosfatidilo, glicerol de difosfatidil y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-ésteres de 3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (alquilo eter)-derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroil y derivados de miristoil de Lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y el positivamente cargado DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosas), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilfosfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, ácido fusídico de derivados (p. ej. taurodihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de las mismas C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados de N α -acilado de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N α -acilado de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un ácido neutral o ácido de amino, derivado de N α -acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutral y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, CAS n° de registro [577-11-7]), docusato de calcio, CAS n° de registro [128-49-4]), docusato de potasio, CAS n° de registro [7491-09-0]), SDS (sulfato de dodecilo de sodio o sulfato de lauril de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de lo mismo, ácidos biliares y sales derivadas y glicina o conjugados de taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, n-Hexadecil-N, n-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, aniónico (alquil-aril-sulfonatos) tensioactivos monovalentes, tensioactivos zwitteriónicos (p. ej. N-alquil-N, N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (p. ej. bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Dodecil β -D-glucopiranosida) poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno para etilenodiamina, o el tensioactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas derivadas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituyen una forma de realización alternativa de la aplicación.

[0200] El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

[0201] Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la composición farmacéutica de la presente aplicación. Tales ingredientes adicionales puede incluir agentes de humidificación, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un ión híbrido (p. ej., un aminoácido tal como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar contrariamente a la estabilidad total de la composición farmacéutica de la presente aplicación.

5 [0202] Composiciones farmacéuticas con un péptido conjugado, tal como por ejemplo un GH conjugado según la presente invención se puede administrar a un paciente en la necesidad de tal tratamiento en diferentes sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, piel y sitios mucosos, en sitios de absorción de baipás, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

10 [0203] Administración de composiciones farmacéuticas según la aplicación puede ser a través de diferentes vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de las mismas, epidérmica, dermal, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, para ejemplos a través de la conjuntiva, uretal, y parenteral a pacientes en la necesidad de tal tratamiento.

15 [0204] Composiciones de la aplicación actual se puede administrar en diferentes formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, bálsamos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos revestidos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, gelatina dura encapsula y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, esprays, polvo, aerosoles, inhalantes, gotas de ojo, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pessarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución de inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo gelificación in situ, ajuste in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión e implantes.

20 [0205] Composiciones de la aplicación puede ser además compuestas en, o fijados a, por ejemplo a través de interacciones electroestáticas y covalentes hidrofóbicas, un portador de fármaco, sistema de administración de medicamentos y sistema de administración de medicamentos avanzado para además mejorar la estabilidad del GH conjugado, aumentar biodisponibilidad, aumentar solubilidad, reducir efectos adversos, conseguir cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar adaptabilidad del paciente o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos de soportes, sistemas de entrega de fármaco y sistemas de entrega de fármaco avanzados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol poli(vinílico), acrilado y polímeros de metacrilato, ácido poliglicólico y poliláctico y copolímeros en bloque de los mismos, glicoles de polietileno, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo sistemas co-poliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de las mismas, fase L2 y dispersiones de las mismas, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fase en los sistemas de agua lipídica, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, auto-emulsionantes, auto-microemulsionable, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.

35 [0206] Composiciones de la aplicación actual son útiles en la composición de sólidos, semi-sólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar de un péptido conjugado, tal como por ejemplo un GH conjugado, usando por ejemplo un inhalador de dosis dosificada, inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos siendo dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

40 [0207] Composiciones de la aplicación actual son en concreto útiles en la composición de sistemas de entrega de fármaco controlados, sostenidos, postergados, retardados y de liberación lenta. Más específicamente, pero no limitado a, composiciones son útiles en la composición de liberación parenteral controlada y sistemas de liberación sostenida (ambos sistemas conduciendo a una reducción múltiple en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluso más preferiblemente, son sistemas de liberación controlada y liberación administrados subcutáneos. Ejemplos de sistema de liberación útil controlada y composiciones son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

50 [0208] Métodos para producir sistemas de liberación controlada útil para composiciones de la aplicación actual incluyen, pero de forma no limitativa, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsión, dispersión, homogenización de alta presión, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fase, evaporación de solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

60 [0209] Administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del péptido conjugado, tal como por ejemplo el GH conjugado en forma de una pulverización pulmonar o nasal. Como una opción más, las composiciones farmacéuticas con el péptido conjugado, tal como por ejemplo el GH conjugado de la invención puede también ser adaptado para administración transdérmica, por ejemplo por inyección sin aguja o de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

65 [0210] El término "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad

química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

[0211] El término "estabilidad física" de la composición de proteína como se utiliza en este caso se refiere a la tendencia de la proteína para formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con interfaces y superficies que estén desestabilizando, tales como superficies e interfaces hidrofóbicas. Estabilidad física de las composiciones de proteína acuosa es evaluada mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez tras exponer la composición llena en contenedores adecuados (p. ej. cartuchos o viales) a estrés mecánico/físico (p. ej. agitación) a temperaturas diferentes durante varios períodos de tiempo. Inspección visual de las composiciones se realiza con una punta de luz preciso con fondo oscuro. La turbidez de la composición se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una composición que muestra ninguna turbidez corresponde a una puntuación visual 0, y una composición que muestra turbidez visual en la luz diurna corresponde a una puntuación visual 3). Una composición es clasificada físico inestable respecto a la agregación de proteína, cuando muestra turbidez visual en la luz diurna. Alternativamente, la turbidez de la composición se puede evaluar por mediciones de turbidez simple bien conocidas por el experto en la materia. Estabilidad física de las composiciones de proteína acuosa puede también ser evaluadas usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una pequeña molécula que preferentemente se enlaza a un conformador no nativo de la proteína. Un ejemplo de una pequeña sonda molecular espectroscópica de estructura de proteína es tioflavina T. Tioflavina T es un tinte fluorescente que ha sido muy usado para la detección de fibrillas de amiloide. En presencia de fibrillas y quizás otras configuraciones de proteína también, tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando está vinculada a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

[0212] Otras pequeñas moléculas se pueden usar como sondas de los cambios en la estructura de proteínas de estados nativos a no nativos. Por ejemplo las sondas "parche hidrofóbico" que enlazan preferentemente a parches hidrofóbicos expuestos de una proteína. Los parches hidrofóbicos están generalmente enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero se exponen cuando una proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas pequeñas sondas moleculares espectroscópicas son colorantes aromáticos hidrofóbicos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de aminoácido de metal, tales como complejos de metal de cobalto de aminoácidos hidrofóbicos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, y valina, o similares.

[0213] El término "estabilidad química" de la composición de proteína como se utiliza en este caso se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína conduciendo a formación de productos de degradación química con menos potencia biológica potencial y/o potenciales propiedades inmunogénicas aumentadas en comparación con la estructura de proteína nativa. Varios productos de degradación química pueden ser formados dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que la proteína se expone. Eliminación de degradación química puede más probablemente no ser completamente evitada y el aumento de las cantidades de productos de degradación química se ve frecuentemente durante almacenamiento y uso de la composición de proteína como bien es conocido por el experto en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a desamidación, un proceso en el que el grupo de amida de cadena lateral en el glutaminil o residuos de asparaginil se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína son de manera covalente enlazadas entre sí a través de transamidación y/o interacciones de disulfuro conduciendo a la formación de dímero de manera covalente enlazado, oligómero y productos de degradación polimérica (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) se pueden mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la composición de proteína se puede evaluar por medición de la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a condiciones diferentes medioambientales (la formación de productos de degradación puede frecuentemente ser acelerada por, por ejemplo, temperatura en aumento). La cantidad de cada producto de degradación individual es frecuentemente determinado por separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño y/o la carga de la molécula usando varias técnicas de cromatografía (p. ej. SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

[0214] Por lo tanto, como perfilado por encima, una "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una composición debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta que la fecha de caducidad sea alcanzada.

[0215] En una forma de realización de la aplicación la composición farmacéutica que comprende el GH conjugado es estable para más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

[0216] En otra forma de realización de la aplicación la composición farmacéutica que comprende el GH conjugado es estable para más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

[0217] En otra forma de realización de la aplicación la composición farmacéutica que comprende el GH conjugado es estable para más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

[0218] En otra forma más de realización de la aplicación la composición farmacéutica que comprende el GH conjugado es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

5 [0219] Todos los encabezamientos y sub-encabezamientos son usados aquí por conveniencia sólo y no deberían ser interpretados como limitadores de la invención de ninguna manera.

10 [0220] El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado aquí, se destina meramente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que sea de otra manera reivindicado. Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado como indicando de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

15 [0221] La citación de documentos de patente se realiza por conveniencia sólo y no refleja cualquier visión de la validez, patentabilidad, y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente.

EJEMPLOS

20 [0222] El péptido a ser conjugado, disuelto en un solvente adecuado, tal como por ejemplo agua, se mezcla con el primer compuesto (como mencionado anteriormente) en 5 a 1000 exceso de pliegue y la transglutaminasa se añade. Transglutaminasas adecuadas son por ejemplo aquellas aisladas de *Streptomyces mobaraenese*, *Streptomyces lyticus* o hígado de conejillo de Indias. La cantidad de transglutaminasa a ser adicionada depende de la velocidad de reacción deseada. Cuanta más enzima se añade, más rápido irá la reacción. La temperatura puede ser ambiente o ligeramente elevada hasta aproximadamente 40°C. Cuando la reacción ha alcanzado un punto deseado, es decir un punto dónde una fracción deseada del péptido a ser conjugado ha sido funcionalizada, el segundo compuesto (como mencionado anteriormente) se añade para proveer el péptido conjugado. El péptido conjugado puede posteriormente ser purificado, por ejemplo por técnicas de columna. Uno o más pasos de purificación adicional puede también ser incluido anteriormente en la secuencia de reacción, por ejemplo para eliminar exceso del primer compuesto o para eliminar la enzima. En el segundo paso, la temperatura se puede elevar para aumentar la velocidad de reacción dado que este paso no depende de la actividad enzimática. Condiciones de reacción típicas se pueden encontrar en Biochem., 35,13072-13080,1996, Bioconjugate Chem., 11, 502-509, 2000, y Bioconjugate Chem., 12, 701-710,1991.

Abreviaturas

35 [0223] TGase: transglutaminasa microbiana de mobaraenae de estreptoverticilio según US 5156956 o de *Streptomyces lydicus* según WO 9606931-A1.

Métodos analíticos:

40 Espectrometría de masas Maldi-Tof.

45 [0224] Pesos moleculares fueron determinados usando el instrumento Autoflex Maldi-Tof (Bruker). Muestras fueron preparadas según el método de sándwich. Matriz 1 fue una solución de 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en 1 ml acetona. Matriz 2 fue una solución de 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en 1 ml 50% acetonitrilo en agua. Muestras fueron preparadas en el aparato para consecutivamente aplicar 1 µl matriz 1, secado de aire, aplicación 1 µl 3% ácido trifluoracético, aplicación 1µl muestra, aplicación 1 µl matriz 2, secado de aire, lavado por descarga de la placa de objetivo con agua y finalmente secado de aire. Los espectros fueron adquiridos usando una potencia de láser de 20% y el método estándar para el intervalo 3-20 kDa que fue suministrado con el instrumento.

50 RP-HPLC.

[0225] Análisis RP-HPLC fue realizado en un módulo de separación Waters 2690 equipado con un detector de red de diodos Waters 996. Una vidac 218TP54 4, 6mm x 250mm 5µm C-18 columna de sílice (The Separations Group, Hesperia) fue usada y la detección fue por UV a 214 nm, 254 nm, 280 nm y 301 nm. La columna fue equilibrada con 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y eluida por un gradiente de 0 a 90% acetonitrilo contra 0,1% ácido trifluoracético /H₂O sobre 50 min a 42°C, con un flujo de 0, 5ml/min.

LC-MS

60 [0226] Análisis LC-MS fue realizado en un espectrómetro de masa PE-Sciex API 100 equipado con dos Microbombas Perkin Elmer Series 200, un automuestreador Perkin Elmer Series 200, un detector de UV Applied Biosystems 785A y un detector de dispersión de la luz vaporizable Sedex 75. Una columna de sílice de 3, 0 mm x 50 mm 5µ C-18 de Waters Xterra fue eluida a 1, 5 ml/min a temperatura ambiente. Fue equilibrado con 5 % acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y eluido durante 1,0 min con 5% acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O y luego con un gradiente lineal a 90% acetonitrilo / 0,1% ácido trifluoracético / H₂O sobre 7 min. La detección fue por detección UV a 214nm y dispersión vaporizable ligera. Una fracción del eluido de columna fue introducida en la interfaz de spray de iones de un espectrómetro de masas PE-Sciex API 100. El intervalo de masa 300-2000 amu fue escaneado cada 2

segundos durante el proceso.

Secuenciación de Edman:

5 [0227] Secuencias de aminoácidos fueron determinadas por degradaciones de Edman automatizadas usando un secuenciador de proteína de modelo de Applied Biosystem Model 494 esencialmente como se describe por el fabricante. En general 50 pmol de péptido fue usado para un análisis. Un residuo de aminoácido derivatizado de ácido graso o PEGilado muestra un ciclo de Edman en blanco.

10 Cuantificación de proteína

[0228] Concentraciones de proteína fueron estimadas por absorbencia de medición a 280 nm usando uno espectrofotómetro de UV. Un coeficiente de extinción molar de $16170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ fue usado. Cantidades fueron calculadas de volúmenes y concentraciones.

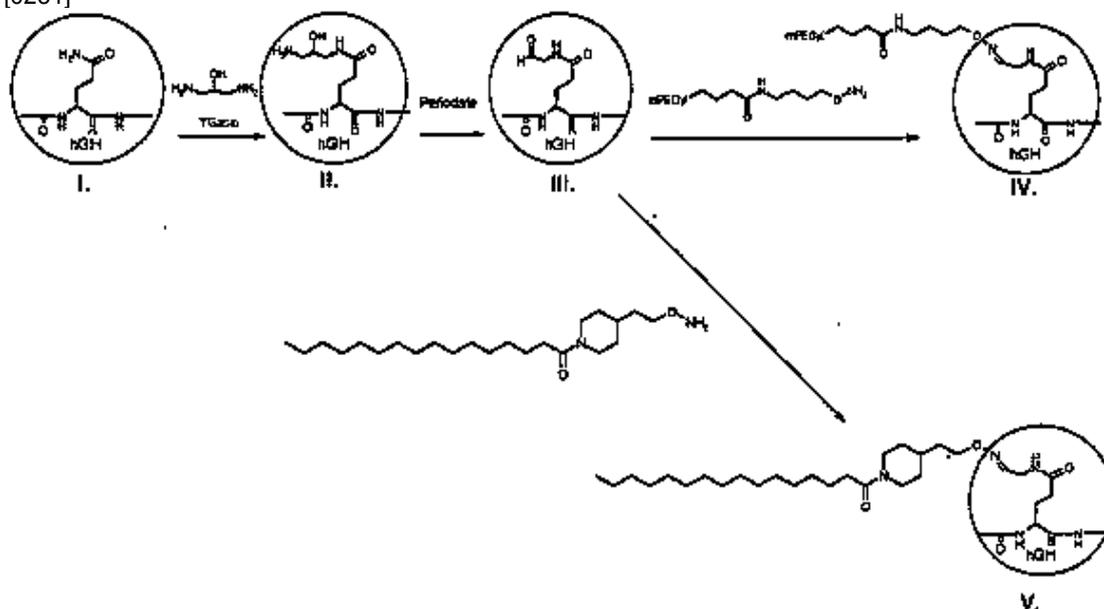
15 Mapeo de péptido enzimático para determinación de sitio(s) de derivatización.

[0229] Mapeo péptido fue realizado usando digestión Asp-N de la proteína alquilada y reducida. Primero la proteína fue tratada con DTT (Ditiotreitol) e iodoacetamida según procedimientos estándar. El producto alquilado fue purificado usando HPLC. Posteriormente el producto purificado alquilado fue digerido durante toda la noche con endoproteasa Asp-N (Boehringer) a una proporción de enzima:substrato de 1:100. El digerido fue HPLC separado usando una columna C-18 y un sistema de tampón de ácido trifluoroacético /acetonitrilo estándar. El mapa peptídico resultante fue comparado con el de hGH no derivatizado y fracciones con tiempos de retención diferente fueron recogidas y además analizadas usando el espectrómetro de masas Maldí-tof.

25 Página SDS

[0230] Electroforesis de gel de SDS poliacrilamida fue realizado usando NuPAGE 4%-12 % geles Bis-Tris (Invitrogen NP0321 BOX). Los geles fueron bañados de plata (Invitrogen LC6100) o bañados de Coomassie (Invitrogen LC6065) y donde fue pertinente también bañados por PEG con yoduro de bario como se describe por M. M. Kurfurst en Anal.Biochem. 200(2):244-248,1992. Esquema ilustrativo para la conjugación de hGH con mPEG o con una fracción lipofílica

[0231]



35 I. hGH, hormona de crecimiento humana

40 II. N^ε 141-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH

III. N^ε 141-(2-oxo-etil) hGH

IV. N^ε 141-[2-(4-(4-(mPEGil)butanoil)-amino-butyl)etil] hGH

45 V. N^ε 141-[2-(1-(hexadecanoyl)piperidina-4-il)etil] hGH

Ejemplo 1. Trans-aminación de hGH (I.) para dar N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

[0232] hGH (I.) (200 mg) fue disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8, 0,14 ml).

[0233] Esta solución fue mezclada con una solución de 1,3-Diamino-propan-2-ol (378 mg) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, 1 ml, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 con ácido clorhídrico diluido después de disolución de 1,3-Diamino-propan-2-ol).

[0234] Finalmente una solución de TGasa (18 mg-40 U) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 1ml) fue añadida y el volumen fue ajustado a 10 ml por adición de tampón de fosfato (50 mM, pH 8) dando una concentración de 1,3-Diamino-propan-2-ol a 0,2 M. La mezcla combinada fue incubada durante 4 horas a 37 °O.

[0235] La temperatura fue bajada a temperatura ambiente y N-etil-maleimida se añadió a una concentración final de 1 mM.

[0236] Después de 1 hora la mezcla fue diluida con 10 volúmenes de tampón tris (50 mM, pH 8,5)

Ejemplo 2. Cromatografía de intercambio de iones de N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

[0237] La solución que resulta del ejemplo 1. fue aplicada a una columna de MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17-5167-01) preequilibrado con tampón A (50 mM tris, pH 8,5). Este fue luego eluido a un flujo de 2 ml/min con un gradiente de 3% a 6% de tampón B (50 mM tris, 2 M NaCl, pH 8,5) en el tampón A más de 40 min. Fracciones fueron recogidas basadas en absorción de UV a 280 nm y análisis Maldi-Tof fue realizado en fracciones seleccionadas. Las fracciones correspondientes al valor máximo dado por el previsto pm según la espectrometría de masa de Maldi-Tof fueron agrupadas.

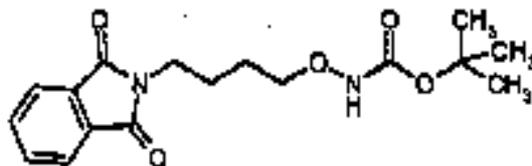
Ejemplo 3 Caracterización de N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.)

[0238] Mapeo peptídico de la agrupación recogido en el ejemplo 2 mostró que el AA 130-146 de fragmento Asp-N mostró un aumento de masa de 73 amu correspondiente a la adición del alcohol de amino en la cadena lateral de un residuo de glutamina. Este fue el único péptido que tuvo tiempo de retención cambiado en el Mapa de HPLC cuando se comparó con el del hGH nativo. Este fragmento contiene dos residuos de glutamina. El péptido fue sometido a secuenciación de Edman y se encontró Gln-137 en el rendimiento previsto, mientras que Gln-141 mostró un ciclo de Edman en blanco. Fue concluido, que la derivatización había tenido lugar selectivamente en Gln-141.

Ejemplo 4. Síntesis de N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

Paso 1: 2-(4-(tert-Butoxicarbonilaminoxil)butil)isoindol-1,3-diona

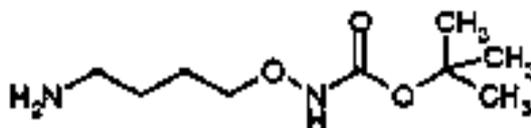
[0239]



[0240] Para una mezcla de N-(4-bromobutil)ftalimida comercialmente disponible (2,82 g, 10 mmol) y N-Boc-hidroxilamina (2,08 g, 15,6 mmol) fue adicionado acetonitrilo (2 ml) y sucesivamente 1, 8-diazabicyclo[5, 4, 0]undec-7-eno (2,25 ml, 15 mmol). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 30 min y luego a 50°C durante 2 días. Fue diluida con una mezcla de agua (30 ml) y 1 ácido N clorhídrico (20 ml). Fue extraído con acetato de etilo (2 x 100 ml). La fase orgánica fue lavada con solución salina (50 ml) y fue secada sobre sulfato magnésico. El producto crudo fue purificado por cromatografía en el sílice (60 g), usando un gradiente de acetato de heptano/etilo 1:0 a 0:1 como eluyente para dar 2,08 g de 2-(4-(tert-butoxicarbonilaminoxil)butil)isoindol-1,3-diona.

Paso 2: éster de tert-butilo de ácido N-(4-aminobutoxi)carbámico

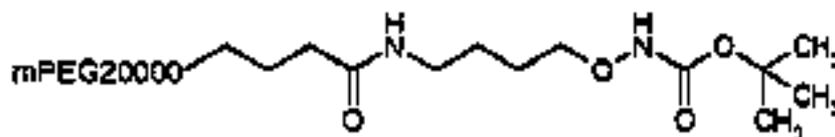
[0241]



[0242] Hidrato de hidracina (1,0 ml, 20 mmol) fue añadido a una solución de 2-(4-(tert-butoxicarbonilaminoxi)butil) isoindol-1,3-diona (2,08 g, 6,22 mmol) en el etanol (8,0 ml). La mezcla reactiva fue agitada a 80°C durante 65 h. El solvente fue quitado al vacío. El residuo fue disuelto en el tolueno (10 ml) y el solvente fue quitado al vacío. El residuo fue suspendido en 1 ácido clorhídrico N (10 ml). La precipitación fue quitada por filtración y fue lavada con agua (2 ml). El filtrado y los líquidos de lavado fueron combinados y hechos básico con carbonato potásico. La solución fue extraída con diclorometano (4 x 20 ml). El estrato orgánico fue secado sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío para dar 0,39 g de éster de terc-butilo ácido de N-(4-aminobutoxi)carbámico. Carbonato potásico (3 g) se añadió a la fase acuosa, que fue extraído con diclorometano (3 x 20 ml). Estas capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío para dar otros 0,39 g de éster de terc-butilo de ácido carbámico de N-(4-aminobutoxi).

Paso 3: éster de terc-butilo de ácido N-(4-(4-(mPEG20000il)butanoliamino)butoxi)carbámico

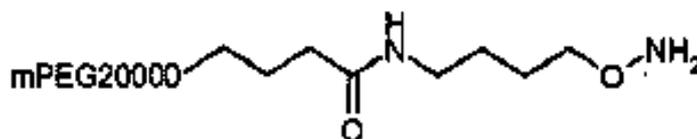
[0243]



[0244] El Éster de n-hidroxisuccinimida comercialmente disponible de ácido de mPEG2000ilbutanoico (Nektar "mPEG-SBA", # 2M450P01, 3 g, 0,15 mmol) fue disuelto en el diclorometano (25 ml). Éster de terc-butilo de ácido de N-(4-aminobutoxi)carbámico (0,12 g, 0,59 mmol) fue añadido. La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente. Éter dietílico fue añadido hasta que una precipitación se obtuvo. La precipitación fue aislada por filtración. El material fue secado al vacío para producir 2,39 g de éster de terc-butilo de ácido de N-(4-(4-(mPEG20000il)butanoliamino)butoxi)carbámico.

Paso 4: N-(4-Aminoxibutil)-4-(mPEG20000il)butanoliamida

[0245]



[0246] Acido trifluoroacético (20 ml) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de ácido carbámico de N-(4-(4-(mPEG20000il)butanoliamino)butoxi) (2,39 g, 0,12 mmol) en el diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada durante 30 min. Se añadió éter dietílico (100 ml). La precipitación formada fue aislada por filtración. Fue lavado con éter dietílico (2 x 100 ml) y secado al vacío para dar 1,96 g de N-(4-Aminoxibutil)-4-(mPEG20000il)butanoliamida.

Ejemplo 5. Oxidación de N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) para dar N^{ε141}-(2-oxoetil) hGH (III.)

[0247] El tampón de las fracciones agrupadas del ejemplo 2 con 48,7 mg de (II.) fue cambiado cuatro veces a un tampón de 15 mM trietanolamina pH 8,5 (ajustada con 1 N de ácido clorhídrico) usando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultra-15 (Millipore). Finalmente la solución fue concentrada a 2 ml. A ésta fue añadido 2 ml de una solución de metionina de 100 mM en un tampón de trietanolamina de 15 mM a pH 8,5. Finalmente 0,4 ml de peryodato de sodio 25 mM fue añadido el agua, y la mezcla fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Luego éste fue enfriado en el hielo y se añadió 1,6 ml de N,N-dimetilformamida helada.

Ejemplo 6. Oximación de N^{ε141}-(2-oxo-etil) hGH (III.) con N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida para dar N^{ε141}-[2-(4-(4-(mpegil)butanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH (IV.) donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa

[0248] 380 mg N-(4-Aminooxi-butil)-4-mpegil-butiramida fue disuelto en 4 ml de agua y pH ajustado a 6,0 con 1 N de ácido clorhídrico. La mezcla que resulta del ejemplo 5 fue luego adicionada lentamente mezclando suavemente y la reacción pasó a temperatura ambiente durante 72 h.

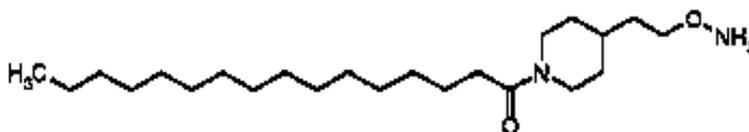
Ejemplo 7. Cromatografía de intercambio de iones de N^{ε141}-[2-(4-(4-(mpegil)butanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH (IV.) donde mpegil es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa

[0249] La solución que resultan del ejemplo 6 fue aplicada a una columna de MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17-5167-01) preequilibrada con tampón A (50 mM tris, pH 8, 5). Este fue luego eluido en un flujo de 0,5 ml/min con un gradiente de 0% a 7% de tampón B (50 mM tris, 2 M NaCl, pH 8,5) en el tampón A sobre 1120 min. Fracciones fueron recogidas basadas en absorción de UV a 280 nm y análisis MALDI-tof fueron realizados en fracciones

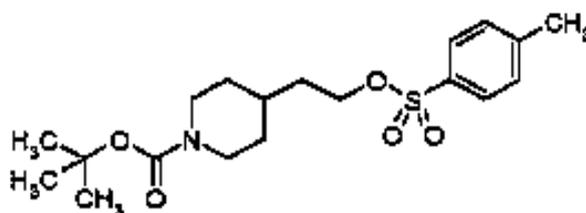
seleccionadas. Las fracciones correspondientes al valor máximo dando el pm esperado según la espectrometría de masa Maldi-Tof fueron agrupadas. Los análisis Maldi-Tof dieron un valor máximo ancho centrado alrededor de 43130 Da de acuerdo con la naturaleza polidispersa de mPEG. La página SDS mostró una única banda con un peso molecular aparente de 60 kDa. La banda bañada tanto con plata como con yoduro de bario, confirmando que era una proteína derivatizada de PEG. Estos resultados analíticos confirmaron que el compuesto de producto aislado fue un derivado mono pegilado de hGH.

Ejemplo 8. Síntesis de 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona

10 [0250]



15 Paso 1: éster de tert-butil de ácido 4-[2-(Tolueno-4-sulfoniloxi)etil]piperidina-1-carboxílico
[0251]



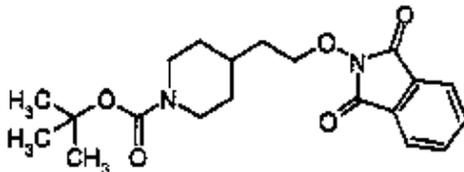
20 [0252] Cloruro de tosilo (4,16 g, 21,8 mmol) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de éster de 4-(2-hidroxietil) piperidina-1-carboxílico disponible comercialmente (p. ej Aldrich 54, 724-7, 5,0 g, 21,8 mmol) y trietilamina (4,25 ml, 30,5 mmol) en el diclorometano (100 ml). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h. Éste fue diluido con acetato de etilo (300 ml) y lavado con un 10% de solución acuosa de sulfato de hidrógeno de sodio (200 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (150 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (250 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (80 g), usando primero acetato/heptano de etilo: 1:2 luego 1:1 como eluyente, para dar 6,04 g de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(tolueno-4-sulfoniloxi)etil]piperidina-1-carboxílico.

30 [0253] ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,05 (m, 2 H); 1, 45 (s, 9 H); 1, 55 (m, 5 H); 2, 50 (s, 3 H); 2, 65 (t, 2 H); 4, 05 (m, 4 H); 7, 35 (d, 2 H); 7, 80 (d, 2 H).

[0254] Paso 2:

35 Éster de tert-butil de ácido 4-[2-(1, 3-Dioxo-1, 3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico

[0255]



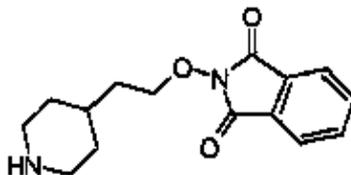
40 [0256] A 0°C, una suspensión de 60% de hidruro de sodio en el aceite mineral (0,69 g, 17,2 mmol) fue adicionado a una solución de N-hidroxifalimida (2,80 g, 17,2 mmol) en N, N-dimetilformamida (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada durante 45 min a 0°C. Una solución de éster de terc-butilo de ácido de 4-[2-(tolueno-4-sulfoniloxi)etil]piperidina-1-carboxílico (5,99 g, 15,6 mmol) en N, N-dimetilformamida (15 ml) y yoduro de tetrabutilamonio (0,17 g, 0,47 mmol) fueron adicionados sucesivamente. La mezcla reactiva fue calentada a 60°C durante 2 días y enfriada a temperatura ambiente. Agua (5 ml) fue añadida cuidadosamente. La mezcla reactiva fue diluida con acetato de etilo (250 ml) y lavada con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (200 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (200 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (150 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El solvente fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (80 g), usando acetato/heptano de etilo 1:1 como eluyente para dar 4, 36 g de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(1, 3-dioxo-1, 3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico.

[0257] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,15 (m, 2 H); 1,50 (s, 9 H); 1,75 (m, 5 H); 2,75 (m, 2 H); 4,10 (m, 2 H); 4,30 (t, 2 H); 7,80 (m, 4 H).

5 Paso 3:

2-(2-(Piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona

[0258]



10

[0259] Ácido trifluoroacético (20 ml) se añadió a una solución de éster de terc-butilo de ácido 4-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)etil]piperidina-1-carboxílico (4,26 g, 11,4 mmol) en diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 50 min. El solvente fue quitado al vacío. El residuo fue disuelto en el diclorometano (50 ml) y el solvente fue quitado al vacío. Éste procedimiento fue repetido dos veces para dar 6,46 g de la sal de trifluoroacetato cruda de 2-(2-(piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona.

MS: $m/z = 275$ $[\text{M}+1]^+$

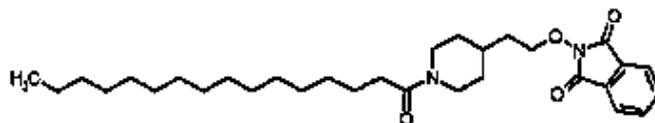
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1,30 (m, 2 H); 1,65 (m, 2 H); 1,90 (m, 3 H); 2,90 (q, 2 H); 3,30 (d, 2 H); 4,20 (t, 2 H); 7,90 (s, 4 H); 8,30 (br, 1 H); 8,65 (br, 1 H).

20

Paso 4:

2-[2-(1-(Hexadecanoil)piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1, 3-diona

[0260]



25

[0261] A 0°C , hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,04 g, 5,44 mmol) fue adicionado a una solución de ácido palmítico (1,40 g, 5,44 mmol) y 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1, 2, 3-benzotriazol (0,89 g, 5,44 mmol) en N,N-dimetilformamida (20 ml) y diclorometano (20 ml). La mezcla reactiva fue agitada a 0°C durante 20 min. Una solución de la sal de trifluoroacetato de 2-(2-(piperidina-4-il)etoxi)isoindol-1,3-diona (2,11 g, 5,44 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml) y etildiisopropilamina (6,19 ml, 38,1 mmol) fueron adicionados sucesivamente. La mezcla reactiva fue agitada durante 16 h, mientras iba calentándose hasta temperatura ambiente. Fue diluido con acetato de etilo (150 ml) y fue lavado con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (150 ml). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con una mezcla de agua (50 ml) y una solución saturada acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (50 ml) y secada sobre sulfato magnésico. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (40 g), usando acetato/heptano de etilo 1:1 como eluyente para dar 1, 52 g de 2-[2-(1-(hexadecanoil) piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1, 3-diona.

MS: $m/z = 513$ $[\text{M}+1]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 0,90 (t, 3 H); 1,10 (m, 2 H); 1,25 (m, 26 H); 1,45 (m, 2 H); 1,65 (m, 1 H); 1,80 (m, 2 H); 2,30 (t, 2 H); 2,95 (t, 1 H); 3,85 (m, 3 H); 4,20 (t, 2 H); 4,40 (d, 1 H); 7,90 (s, 4 H).

40

Paso 5:

[0262] Hidrato de hidracina (0,14 ml, 2,96 mmol) fue añadido a una solución de 2-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etoxi]isoindol-1,3-diona (1,52 g, 2,96 mmol) en etanol (30 ml). La mezcla reactiva fue calentada a reflujo durante 75 min y enfriada a temperatura ambiente. La precipitación formada fue quitada por filtración. El solvente del filtrado fue quitado al vacío. El producto bruto fue purificado por cromatografía de llamarada en el sílice (30 g), usando una mezcla de amoníaco acuoso de diclorometano/metanol/25% (100:10:1) como eluyente, para dar 800 mg de 1-[4-(2-(aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona.

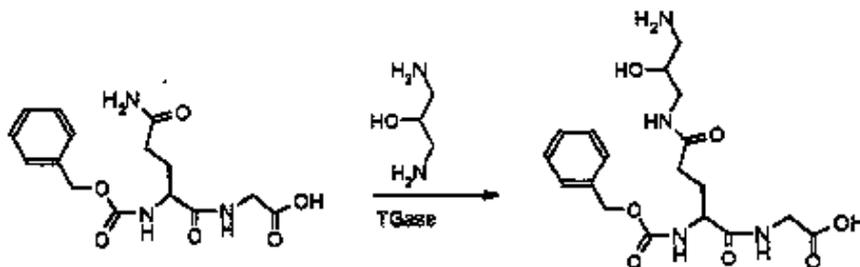
MS: $m/z = 383$ $[\text{M}+1]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0,80 (t, 3 H); 1,25 (m, 2 H); 1,60 (m, 26 H); 1,70 (m, 4 H); 1,65 (m, 3 H); 2,70 (t, 2 H); 2,60 (t, 1 H); 3,05 (t, 1 H); 3,80 (m, 3 H); 4,60 (d, 1 H).

50

55 **Ejemplo 9. Transaminación de Z-Gln-Gly para dar ácido [4-(3-amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxycarbonilamino-butirilamino]-acético**

[0263]

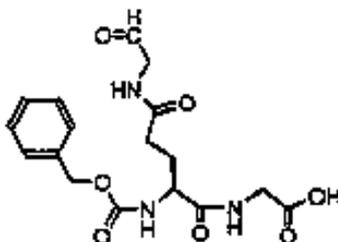


5 30 mg de Z-Gln-Gly (Bachem C1635) fue disuelto en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 2 ml).

[0264] Para esto fue añadida una solución de 1,3-Diamino-propan-2-ol (9 mg) en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 después de la disolución de 1,3-Diamino-propan-2-ol, 0,9 ml). Finalmente una solución de TGasa (0,9 mg ~ 2 U) disuelta en el tampón de fosfato (50 mM, pH 8,0, 0,1 ml) fue añadida y la mezcla combinada fue incubada durante 4 horas a 37 °C. La temperatura fue bajada a temperatura ambiente y N-etil-maleimida se añadió en una concentración final de 1 mM. Una hora más tarde la mezcla fue diluida con 10 volúmenes de agua. El producto fue aislado de esta solución por HPLC semipreparativa de una sola vez en una columna de 25 mm x 250 mm con 7µm C-18 sílice. La columna fue eluida con un gradiente de 10 a 30% de acetonitrilo en 0,1% de ácido de trifluoroacético / H₂O a 10 ml/min a una temperatura de 40°C durante 50min. El péptido con fracciones correspondientes al valor máximo mayor fueron recogidas, diluidas en 30 ml con aproximadamente 3 volúmenes de H₂O y liofilizadas. El producto final obtenido fue caracterizado por el hecho de que RP-HPLC dónde éste tenía un tiempo de retención de 12, 75 min y por LC-MS dónde un tiempo de retención de 1,9 min tuvo un valor máximo de masa correspondiente a M + H⁺ de 411,5 amu que fue de acuerdo con la estructura prevista.

20 **Ejemplo 10. Oxidación de ácido de [4-(3-Amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxycarbonilamino-butirilamino]-acético para dar ácido de [2-Benziloxycarbonilamino-4-(2-oxo-etilcarbamoil)-butirilamino]-acético**

[0265]



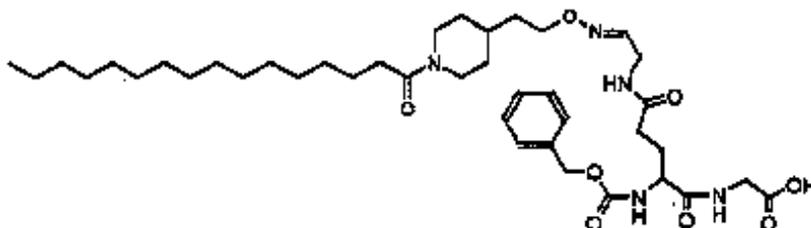
25

[0266] 0,8 mg de ácido de [4-(3-Amino-2-hidroxi-propilcarbamoil)-2-benziloxycarbonilamino-butirilamino]-acético fue disuelto en un tampón de trietanolamina de 4 ml 15 mM pH 8,5 (ajustado con 1 N de ácido clorhídrico). A ello fue añadido 1 ml de una solución de metionina 173 mM en el agua. Finalmente 0,5 ml de un peryodato de sodio 24 mM en agua fue añadido, y la mezcla fue incubada durante 10 min a 0 °C.

30

Ejemplo 11. Oximación de ácido de [2-Benziloxycarbonilamino-4-(2-oxo-etilcarbamoil)-butirilamino]-acético para dar ácido de (2-Benziloxycarbonilamino-4-{2-[2-(1-hexadecanoil-piperidina-4-il)-etoxiimino]-etilcarbamoil}-butirilamino)-acético.

35 [0267]



[0268] 2 mg 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona fue disuelto en 3 ml de N, N-dimetilformamida y la solución fue enfriada en el hielo. Para 0,53 ml de esta solución fue añadida 1,38 ml de la mezcla reactiva del Ejemplo 10 y se dejó reaccionar la mezcla a 0 °C durante toda la noche. RP-HPLC confirmó la formación de un producto nuevo. Fue aislado por RP-HPLC en la escala analítica y sometido a espectrometría de masas de Maldi-TOF que dio un valor máximo correspondiente a M + H⁺ a: 744, 7 amu de acuerdo con la estructura prevista.

40

Ejemplo 12. Oxidación de N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) para dar N^{ε141}-(2-oxo-etil) hGH (III.)

5 [0269] 5 mg N^{ε141}-(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH (II.) fue disuelto en 0,5 ml de tampón de trietanolamina 15 mM pH 8,5 (ajustado con 1 ácido clorhídrico N). Para esto fue añadido 0,13 ml de una solución de metionina 173 mM en el agua. Finalmente 0,06 ml de un peryodato de sodio 24 mM en el agua fue añadido, y la mezcla fue incubada durante 10 min a 0 °C

10 Ejemplo 13. Oximación de N^{ε141}-(2-oxo-etil) hGH (III.) con 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona para dar N^{ε141}-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH (V.).

15 [0270] 2 mg 1-[4-(2-(Aminooxi)etil)piperidina-1-il]hexadecan-1-ona fue disuelto en 3 ml N, N-dimetilformamida y la solución fue enfriada en el hielo. 0,14 ml de la mezcla reactiva del Ejemplo 12 fue añadida y la mezcla se dejó reaccionar a 0 °C durante toda la noche.

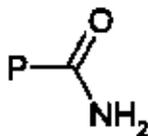
15 Ejemplo 14. Caracterización de N^{ε141}-[2-(1-(hexadecanoil)piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH (V.)

20 [0271] Una alícuota de la mezcla reactiva cruda del Ejemplo 13 fraccionada por RP-HPLC en la escala analítica y espectrometría de masas de Maldi-TOF fue realizadas en las fracciones. La fracción que da el peso molecular previsto de la estructura de producto fue sometida a mapeo peptídico. El mapa mostró que el AA 130-146 del fragmento Asp-N ofrecía un aumento de masa de 407 amu correspondiente a la adición del 2-(1-(hexadecanoil) piperidina-4-il)etiloxiimino)-etil en la cadena lateral de un residuo de glutamina. Este fue el único péptido, que tenía tiempo de retención cambiado en el Mapa de HPLC cuando se comparó con el de hGH nativo. Este fragmento contiene dos residuos de glutamina. El péptido fue sometido a secuenciación de Edman y Gln-137 fue encontrado en el rendimiento previsto, mientras que Gln-141 mostró un ciclo de Edman en blanco. Se concluyó que esta derivatización había tenido lugar selectivamente en Gln-141.

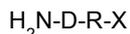
REIVINDICACIONES

1. Método para conjugar péptidos, dicho método incluyendo las etapas de

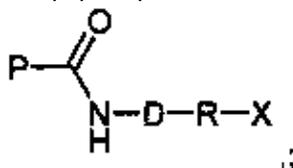
i) reaccionar en uno o más pasos un residuo de Gln con péptido representado por la fórmula



5 con un nitrógeno con nucleófilo (primer compuesto) representado por la fórmula



10 que incluye uno o más grupos funcionales o grupos latentes funcionales, que son no accesibles en cualquiera de los residuos de aminoácidos constituyendo dicho péptido, en presencia de transglutaminasa capaz de catalizar la incorporación de dicho primer compuesto en dicho péptido para formar un péptido transaminado de la fórmula



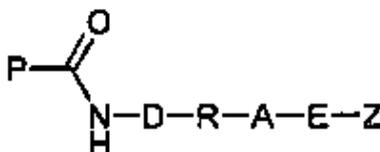
y

ii) opcionalmente activar el grupo latente funcional X; y

15 iii) reaccionar en uno o más pasos dicho péptido transaminado con un segundo compuesto de la fórmula



20 que incluye uno o más grupos funcionales, donde dicho(s) grupo(s) funcional(es) no reacciona(n) con grupos funcionales accesibles en los residuos de aminoácidos constituyendo dicho péptido, y donde dicho(s) grupo(s) funcional(es) en dicho segundo compuesto es capaz de reaccionar con dicho(s) grupo(s) funcional(es) en dicho primer compuesto de modo que un enlace covalente entre dicho péptido transaminado y dicho segundo compuesto es formado dando como resultado un péptido conjugado de la fórmula



25 donde D representa un enlace u oxígeno;

R representa un enlazador o un enlace;

X representa un radical que comprende un grupo funcional o un grupo latente funcional no accesible en los residuos de aminoácido que constituyen el péptido P-C(O)-NH₂;

30 Y representa un radical que comprende uno o más grupos funcionales estos grupos reaccionando con grupos funcionales presentes en X, y estos grupos funcionales no reaccionando con grupos funcionales accesibles en el péptido P-C(O)-NH₂;

E representa un enlazador o un enlace;

A representa una fracción de oxima, hidrazona, fenilhidrazona, semicarbazona, triazol o isooxazolidina, la fracción formada por la reacción entre los grupos funcionales comprendidos en X y Y; y

35 Z es la fracción que debe ser conjugada al péptido.

2. Método según la reivindicación 1, donde el grupo funcional o grupo latente funcional comprendido en X se selecciona de o puede ser activado para ceto-, aldehído-, -NH-NH₂-, -O-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(S)-NH-NH₂-, -NHC(O)-NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, **-NH-NH-C(S)-NH-NH₂**-, -NH-C(O)-C₆H₄-NH-NH₂-, -C(O)-NH-NH₂-, -O-NH₂-, -C(O)-O-NH₂-, -NH-C(O)-O-NH₂-, -NH-C(S)-O-NH₂-, alquina, azida o nitril-óxido.

40

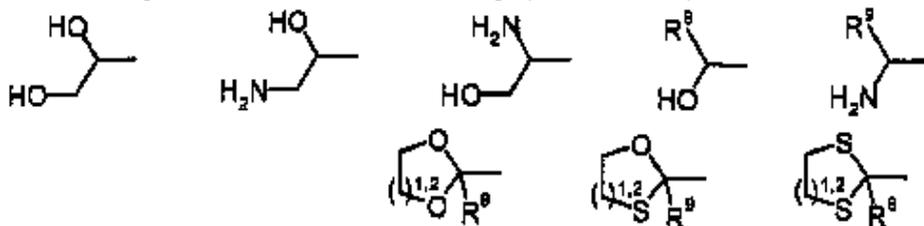
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el grupo funcional presente en Y es seleccionado de entre ceto-, aldehído-, -NH-NH₂-, -O-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(S)-NH-NH₂-, -NHC(O)-NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-NH-C(S)-NH-NH₂-, -NH-C(O)-C₆H₄-NH-NH₂-, -C(O)-NH-NH₂-, -O-NH₂-, -C(O)-O-NH₂-, -NH-C(O)-O-NH₂-, -NH-C(S)-O-NH₂-, alquina, azida y nitril-óxido.

45

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde X se selecciona de o se puede activar para derivados de aldehído o de ceto, e Y se selecciona de -NH-NH₂-, -O-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-C(S)-NH-NH₂-, -NHC(O)-NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-NH-C(O)-NH-NH₂-, -NH-NH-C(S)-NH-NH₂-, -NH-C(O)-C₆H₄-NH-NH₂-, -C(O)-NH-NH₂-, -O-NH₂-, -C(O)-O-NH₂-, -NH-C(O)-O-NH₂-, y -NH-C(S)-O-NH₂

50

5. Método según la reivindicación 4, donde el grupo latente comprendido en X es seleccionado entre



5 donde R^9 es seleccionado entre H, C_{1-6} alquilo, arilo y heteroarilo.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde X e Y cada uno representa un elemento diferente del grupo que consiste en alquino y triazol, o del grupo que consiste en alquino y nitril-óxido.

10 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho nitrógeno con nucleófilo se selecciona de 4-(aminometil)fenil etanona, 4-(2-aminoetil)fenil etanona, N-(4-acetilfenil) 2-aminoacetamida, 1-[4-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1-[3-(2-aminoetoxi)fenil]etanona, 1,4-bis(aminoxi)butano, 3-oxapentano-1,5-dioxiamino, 1,8-diaminoxi-3,6-dioxaoctano, 1,3-bis(aminoxi)propan-2-ol, 1,11-bis(aminoxi)-3,6,9-trioxaundecano, 1,3-diamino-2-propanol, 1,2-bis(aminoxi)etano, y 1,3-bis(aminoxi)propano.

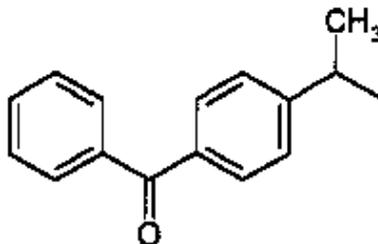
15 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Z comprende uno o más PEG o radicales de mPEG y derivados de amino de los mismos (incluido PEG ramificado y lineal y radicales de mPEG); alquilo C_{1-22} lineal, ramificado y/o cíclico, alqueno C_{2-22} , alquino C_{2-22} , heteroalquilo C_{1-22} , heteroalqueno C_{2-22} , heteroalquino C_{2-22} , donde uno o más biradicales de compuesto aromático homocíclico o biradicales de compuesto heterocíclico pueden ser insertados, y donde dichos radicales C_{1-22} o C_{2-22} pueden ser opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, carboxilo, heteroarilo y arilo, donde dicho arilo o heteroarilo puede opcionalmente ser sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de hidróxilo, halógeno, y carboxilo; radicales de esteroide; radicales lípidos; radicales polisacáridos; dextranos; radicales de poliamida; radicales de ácido poliamínico; radicales de PVP; radicales de PVA; poli(1-3-dioxalano); poli(1, 3, 6-trioxano); polímero de etileno/anhídrido maléico; materiales de tinte de Cibacron; o azul Cibacron 3GA.

9. Método según la reivindicación 8, donde Z comprende uno o más PEG o radicales de mPEG con un peso molecular alrededor de entre 10 kDa y 40 kDa.

30 10. Método según la reivindicación 9, donde Z representa uno o más PEG o radicales de mPEG con un peso molecular alrededor de entre 10 kDa, 20kDa, 30 kDa o 40 kDa.

11. Método según la reivindicación 8, donde Z comprende uno o más alquilo C_{10-20} .

35 12. Método según la reivindicación 6, donde Z comprende uno o más alquilo C_{15} , alquilo C_{17} , azul Cibacron 3GA o radical de la fórmula



40 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la enzima es transglutaminasa aislada de *Streptomyces mobaraenese*, *Streptomyces lydicus* o hígado de conejillo de Indias.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde P representa un péptido seleccionado de insulina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2), hormona de crecimiento, citocinas, TFF, modificadores de receptores de melanocortina y compuestos de Factor VII.

45 15. Método según la reivindicación 14, donde P representa la hormona de crecimiento.