

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 622**

51 Int. Cl.:

C07K 14/65 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2008 E 11162132 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2390265**

54 Título: **Derivado peptídico insulínico en el que se ha modificado su aminoácido N-terminal**

30 Prioridad:

16.07.2007 KR 20070071071
29.11.2007 US 991155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2014

73 Titular/es:

HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon,
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-813, KR

72 Inventor/es:

SONG, DAE HAE;
LIM, CHANG KI;
KIM, YOUNG HOON;
KWON, SE CHANG;
LEE, GWAN SUN;
BAE, SUNG MIN y
JUNG, SUNG YOUB

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 444 622 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

Derivado peptídico insulínico en el que se ha modificado su aminoácido N-terminal

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un derivado peptídico insulínico que tiene una actividad insulínica mejorada. En particular, la presente invención se refiere a un péptido insulínico con el aminoácido N-terminal modificado que tiene una alta estabilidad y actividad insulínica.

Antecedente de la invención

10 Los péptidos tienden a desnaturalizarse fácilmente debido a su estabilidad baja, a que se degradan por enzimas proteolíticas *in vivo*, perdiendo así su actividad, y tienen un tamaño relativamente pequeño, de manera que pueden pasar fácilmente a través del riñón. En consecuencia, con el fin de mantener el nivel sanguíneo y la concentración de un medicamento que comprende un péptido como componente farmacéuticamente eficaz, es necesario administrar el fármaco peptídico frecuentemente al paciente para mantener el nivel sanguíneo deseado y la concentración. Sin embargo los fármacos peptídicos se administran normalmente en forma de preparaciones inyectables, y tal administración frecuente para mantener los niveles sanguíneos de los péptidos fisiológicamente activos produce un gran dolor a los pacientes. Para resolver estos problemas, se han hecho muchos esfuerzos. En uno de tales esfuerzos, se ha sugerido una estrategia en la que se aumenta la transmisión a través de membrana biológica del fármaco peptídico, y entonces el fármaco peptídico se transfiere al cuerpo por inhalación orofaríngea o nasofaríngea. Sin embargo, en esta estrategia aún es difícil que se mantenga la actividad *in vivo* del fármaco peptídico debido a la extremadamente baja eficacia de la transferencia *in vivo*, cuando se compara con las preparaciones inyectables.

20 Por otro lado, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en la sangre del fármaco peptídico, y mantener el fármaco en la sangre a un nivel alto durante un periodo de tiempo prolongado, maximizando de esta manera la eficacia farmacéutica del fármaco. Se necesita por tanto la preparación de acción prolongada de tal fármaco peptídico para aumentar la estabilidad del fármaco peptídico, y para mantener las concentraciones a niveles lo suficientemente altos sin causar respuestas inmunitarias en los pacientes.

30 Como procedimiento para estabilizar el péptido, e inhibir la degradación por una enzima proteolítica, se han llevado a cabo algunos intentos para modificar una secuencia aminoacídica específica que es sensible a la enzima proteolítica. Por ejemplo, el GLP-1 (7-37 o 7-36 amida), que funciona reduciendo la concentración de glucosa en la sangre para el tratamiento de la diabetes Tipo 2, tiene una vida media corta de la actividad fisiológica de aproximadamente 4 minutos o menos (Kreymann y col., 1987), debido a la pérdida de concentración del GLP-1 por medio de la escisión entre el 8º aminoácido (Ala) y el 9º aminoácido (Asp) por una dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Como resultado, se han hecho varias investigaciones sobre un análogo del GLP-1 que tiene resistencia a la DPP-IV, y se han hecho intentos para sustituir la Ala⁸ con Gly (Deacon y col., 1998; Burcelin y col., 1999), o con Leu o D-Ala (Xiao y col., 2001), para así aumentar la resistencia a la DPP-IV, mientras que se mantiene su actividad. El aminoácido N-terminal His⁷ del GLP-1 es crítico para la actividad del GLP-1, y sirve como diana para la DPP-IV. En consecuencia, la Patente de Estados Unidos N° 5.545.618 describe que se modifica el extremo N con un grupo alquil o acil, y Gallwitz y col. describe que se sometió la His⁷ a N-metilación, o alfa-metilación, o bien la His fue sustituida completamente con imidazol para aumentar la resistencia a la DPP-IV, y mantener la actividad fisiológica. Aunque se aumente la resistencia a la dipeptidil peptidasa para mejorar su estabilidad, se ha descubierto que los derivados con His⁷ modificada tienen una afinidad marcadamente reducida para el receptor con menor estimulación del AMPc a la misma concentración (Gallwitz y col., Regulatory Peptide 79:93-102(1999), Regulatory Peptide 86:103-111(2000)).

40 Además del GLP-1, las exendinas son péptidos que se han encontrado en el veneno del monstruo de Gila, un lagarto común en Arizona y el norte de Méjico. La exendina-3 está presente en el veneno de *Heloderma horridum*, y la exendina-4 está presente en el veneno de *Heloderma suspectum*. Las exendinas tienen una alta homología de un 53% con el GLP-1 (Goke, y col., J. Bio. Chem., 268:19650-55(1993)). La exendina-4 supuestamente actúa en los receptores GLP-1 de las células específicas secretoras de insulina, en las células acinares dispersas del páncreas de cobayas, y en las células parietales del estómago, y se ha dicho que el péptido también estimula la liberación de somatostatina e inhibe la liberación de gastrina en estómagos aislados. Además, se descubrió que la exendina-3 y la exendina-4 supuestamente estimulan la producción de AMPc en las células acinares pancreáticas, y estimulan la liberación de amilasa por las células acinares pancreáticas. Como la exendina-4 (Patente de Estados Unidos N° 5.424.686) tiene una secuencia de His-Gly, en vez de His-Ala que es la que funciona como sustrato de dipeptidil peptidasa en el GLP-1, tiene resistencia a la DPP-IV, y una actividad fisiológica más alta que el GLP-1. Como resultado, tiene una vida media *in vivo* de 2 a 4 horas, que es más larga que la de GLP-1. Aunque la exendina nativa tiene una vida media *in vivo* mayor que el GLP-1, su actividad fisiológica no es lo suficientemente prolongada. Por ejemplo, en el caso de una exendina-4 disponible comercialmente (exenatida), se necesita inyectar al paciente dos veces al día, lo que sigue siendo difícil para los pacientes.

Para mejorar la eficacia terapéutica de la exendina nativa, se han hecho intentos para preparar sus análogos, derivados y variantes. La expresión "análogo o variante" típicamente se refiere a un péptido preparado por sustitución, deleción o inserción de uno o más aminoácidos en o del péptido nativo. El término "derivado" se refiere a un péptido modificado químicamente, preparado por alquilación, acilación, esterificación, o amidación de uno o más aminoácidos del péptido nativo.

Se han descrito nuevos compuestos agonistas de la exendina en la Solicitud PCT N° PCT/US98/16387. Reivindicando la prioridad del mismo, se desvela un procedimiento para reducir la ingesta de comida con la utilización de exendina en la Patente de Estados Unidos N° 6956026. Además, reivindicado la prioridad sobre la solicitud PCT, se desvela en el documento EP0996459 el uso de exendinas y análogos de las mismas para la reducción de ingesta de comida y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 7157555 compuestos agonistas de la exendina. Sin embargo, simplemente desvelan varias secuencias de análogos de exendina. Además, no hacen mención de la actividad y propiedad con respecto a dichos análogos, los cuales tampoco se respaldan por la descripción detallada.

Divulgación

Problema técnico

En consecuencia, los presentes inventores comprobaron que los derivados de exendina His¹ modificada muestran una estabilidad sanguínea y una actividad insulínica mayores que una exendina nativa, completando de esta manera la presente invención.

Solución técnica

Un objeto de la presente invención es proporcionar derivados peptídicos insulínicos que tienen una estabilidad sanguínea y actividad insulínica mejoradas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes, que comprende el derivado peptídico insulínico que tiene una actividad insulínica mejorada.

Descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra la estabilidad de los derivados de la exendina-4 en el suero. A: exendina-4, D: DA-exendina-4, H: HY-exendina-4, C: CA-exendina-4.

La fig. 2 muestra las actividades insulínicas de la exendina-4 y el derivado de la exendina-4, CA-exendina-4.

La fig. 3 muestra el efecto de disminución de la glucosa sanguínea de la exendina-4, y la CA-exendina-4 en modelos animales diabéticos.

Mejor modo

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un derivado peptídico insulínico que tiene una estabilidad sanguínea y actividad insulínica mejoradas.

El derivado de acuerdo con la presente invención es un derivado que tiene el resto de histidina N-terminal modificado químicamente, o un derivado que tiene el grupo amino del resto histidina N-terminal modificado químicamente.

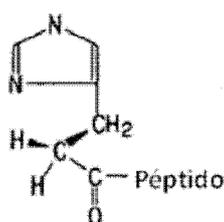
Preferentemente, el péptido insulínico de acuerdo con la presente invención es exendina-4, exendina-3 o derivados de los mismos. La expresión "derivado de exendina-4 o exendina-3" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido preparado por la sustitución, deleción y/o adición de uno o más aminoácidos de la exendina-4 o la exendina-3, o un péptido que tiene uno o más restos aminoácidos modificados químicamente, por ejemplo, por alquilación, acilación, esterificación o amidación, y cuya actividad es equivalente a la de la exendina-4 nativa.

Como ejemplos de los derivados de la exendina-3 o la exendina-4, se desvela en el documento WO 97/46584 un derivado de exendina-4 preparado por deleción del extremo C de la exendina-4 o la sustitución de un aminoácido de la exendina-4 con un aminoácido no natural, la norleucina. También el documento WO99/07404 desvela derivados de la exendina cuyos aminoácidos se han sustituido con aminoácidos no naturales, por ejemplo pentil glicina, homoprolina o tert-butilglicina, y el documento US2008/0119390 desvela derivados de la exendina que consisten en secuencias de aminoácidos más cortas que la exendina-4 nativa que se preparan por deleción de algunos restos aminoácidos de la exendina-4 y preparados por sustitución de algunos restos aminoácidos de la exendina-4 por otros restos aminoácidos.

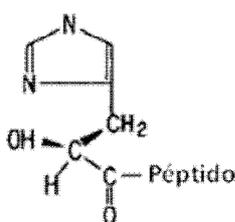
Específicamente, la presente invención también puede englobar un derivado de la misma con la eliminación del grupo amino de la histidina N-terminal (derivado desamino-histidil), un derivado de la misma preparado por sustitución del grupo amino por un grupo hidroxilo (derivado beta-hidroximidazolpropionil), un derivado de la misma preparado por modificación del grupo amino con dos restos metilo (derivado dimetil-histidil), un derivado de la misma preparado por sustitución del grupo amino con un grupo carboxilo (derivado beta-carboximidazolpropionil), o un

derivado de la misma por eliminación de la carga positiva del grupo amino, en el que el carbono alfa del resto histidina N-terminal se elimina para permanecer solamente el grupo imidazoacetil (derivado imidazoacetil).

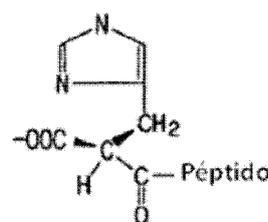
5 Preferentemente, la presente invención proporciona derivados de la exendina-4 que tienen una modificación del grupo amino en el extremo N o resto aminoácido, más preferentemente derivados de la exendina-4 en los que se ha sustituido el grupo alfa amino o alfa carbono del resto histidina N-terminal (el primer aminoácido de la exendina-4), y aún más preferentemente la imidazoacetil-exendina-4 (CA-exendina-4) con la eliminación del carbono alfa del resto histidina N-terminal.



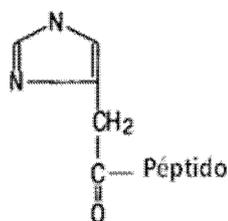
Des-amino-histidil
(DA)- Exendina-4



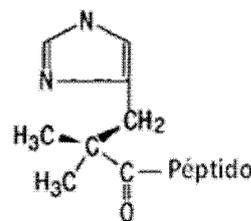
Beta-hidroxi-imidazopropionil
(HY) - Exendina-4



Beta-carboxil-imidazopropionil
(CX) - Exendina-4



imidazoacetil
(CA) - Exendina-4



Dimetil-histidil
(DM) - Exendina-4

10 De acuerdo con un aspecto específico, la presente invención se refiere a un derivado peptídico insulínotropico que comprende un aminoácido de la siguiente fórmula 1.



en la que R1 es 4-imidazoacetil

R2 es seleccionado de entre el grupo que consiste en -NH₂, -OH y -Lys,

X es seleccionado de entre el grupo que consiste en

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-G

lu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Se

r-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser,

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-G

lu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly,

15

y

Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-G

lu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Se

r-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser;

Y es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg, y Z es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg.

5 El derivado peptídico insulínico preferido tiene la fórmula 1, en la que R1 se selecciona de desamino-histidil, N-dimetil-histidil, beta-hidroxi imidazopropionil, 3-imidazoacetil y beta-carboximidazopropionil, Y es Lys o Ser, Z es Lys, y R2 es -NH₂,

De acuerdo con otro aspecto específico, la presente invención se refiere a un derivado peptídico insulínico que comprende un aminoácido de la siguiente Fórmula 2.

R3-X'-R4 <Fórmula 2>

10 en la que R3 es 4-imidazoacetil;
X' es

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-G

lu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Se

r-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

o

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-G

lu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly;

15 R4 es -NH₂;
Y es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg; y Z es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg.

20 En términos de su actividad, la modificación química en el resto histidina N-terminal de la exendina-4 tiene un efecto distinto que en el otro péptido insulínico GLP-1. Se puede esperar que la modificación química en el resto histidina N-terminal del GLP-1 por ejemplo, α -metil-GLP-1, n-metil-GLP-1, o imi-GLP-1, inhiba la degradación por la dipeptidil peptidasa, de manera que se aumente la estabilidad, y de hecho, se comunicó que había una reducción práctica de la degradación. Sin embargo, también se comunicó que tenían una afinidad por el receptor relativamente reducida con una estimulación del AMPc baja, cuando se comparaba con el GLP-1 nativo.

25 Por el contrario, en el caso en que la dipeptidil peptidasa no escinde la exendina-4, sería difícil predecir el efecto de la modificación en el resto histidina N-terminal sobre su actividad, en particular, su efecto sobre la afinidad al receptor y la concentración de glucosa en la sangre.

30 En consecuencia, la presente invención proporciona un derivado de la exendina-4 que tiene un resto histidina N-terminal modificado químicamente o que tiene el grupo amino del resto histidina N-terminal modificado químicamente, el cual muestra inesperadamente una excelente actividad insulínica al compararse con la exendina-4 nativa. Estos derivados presentan una estabilidad sanguínea y una actividad insulínica *in vitro* excelentes, al compararse con la exendina-4 nativa (Fig. 2). En la práctica, se descubrió en ratones diabéticos db/db, que presentaban un efecto excelente en la reducción de la concentración de glucosa en sangre, al compararse con la exendina-4 nativa (Fig. 3). Se cree que el cambio en la carga neta debida a la modificación en el grupo amino del resto histidina N-terminal o el cambio del tamaño del resto de histidina produce una diferencia en la sensibilidad al ataque proteolítico en la sangre o que afecta a la afinidad por el receptor. Sin embargo, se necesitan estudios moleculares más extensos sobre el tema. Se espera que tal propiedad maximice la actividad insulínica intrínseca de la exendina-4, por tanto, el efecto terapéutico sobre la diabetes tipo 2, y que induzca la reducción de la ingestión de alimento, el retraso del vaciado gástrico o similares.

40 Los derivados imidazoacetil-exendina-4 (CA-exendina-4) de la exendina-4 de la presente invención se preparan eliminando y sustituyendo el grupo amino alfa del resto histidina N-terminal o eliminando el carbono alfa del resto histidina N-terminal. Por tanto, no están limitados a otras secuencias aminoácidas, siempre y cuando mantengan su actividad. Además, es obvio para los expertos en la técnica que los derivados de la exendina-4 se modifican por procedimientos típicos que incluyen la modificación de polímeros tales como el PEG y la cadena de azúcares y la fusión con albúmina o transferrina, con el fin de aumentar su efecto terapéutico, siendo superior a la exendina-4 nativa.

45 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento

de la diabetes que comprende el derivado peptídico insulínico.

El término "administración" como se utiliza en el presente documento significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente por ciertos procedimientos adecuados. El conjugado de la presente invención se puede administrar por cualquier vía de las vías comunes, siempre y cuando sea capaz de alcanzar el tejido deseado. Se contemplan una variedad de modos de administración, incluyendo la vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración ejemplificados. Sin embargo, como los péptidos se digieren en la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deberían estar revestidos o formulados para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferentemente, la presente composición se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar utilizando un cierto sistema capaz de transportar los ingredientes activos a la célula diana.

La composición farmacéutica que comprende el conjugado de la presente invención además puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un desintegrante, un excipiente, un disolvente, un agente dispersante, un estabilizante, un agente suspensor, un agente colorante, y un perfume. Para las preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tamponante, un agente conservante, un analgésico, un disolvente, un agente isotónico, y un estabilizante. Para la administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un agente conservante. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una variedad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en tabletas, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para las preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en forma de unidades de dosificación, tal como un envase multidosis o una ampolla como forma de dosis única. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de larga duración.

Por otra parte, ejemplos del vehículo, el excipiente y el diluyente adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato magnésico y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir además cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

La frecuencia de administración y la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención se puede determinar por varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades a tratarse, las vías de administración, la edad del paciente, el género, peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármacos que incluye como principio activo. Como la composición farmacéutica de la presente invención tiene una excelente duración de la eficacia *in vivo* y de la concentración, se puede reducir de manera importante la frecuencia de administración y la dosis de los fármacos farmacéuticos de la presente invención.

Los derivados insulínicos de acuerdo con la presente invención no han sido desvelados anteriormente por otros inventores, ni ha sido desvelada ampliamente ninguna secuencia aminoacídica específica ni se han comparado sus actividades con las de la exendina-4 nativa, otros derivados y variantes. Por lo tanto, no se esperaba nunca que los derivados de la exendina-4 en los que se han sustituido o eliminado el grupo amino alfa o carbono alfa N-terminal ejercieran de manera importante actividades excelentes. En consecuencia, la excelente estabilidad en el suero y la actividad insulínica de los derivados peptídicos insulínicos de acuerdo con la presente invención maximizan un efecto terapéutico sobre la diabetes tipo 2.

Modo de la invención

Posteriormente en el presente documento, se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no para interpretarse como un límite de la presente invención.

Ejemplo 1. Estabilidad en el plasma del derivado de exendina-4

Para medir la estabilidad de los derivados de la exendina-4 en el plasma, se expusieron a plasma tanto la Exendina-4 nativa como los derivados de la Exendina-4, y las cantidades de las proteínas restantes no desnaturizadas se midieron por HPLC de fase inversa para realizar un ensayo de desnaturización dependiente del tiempo de exposición.

En el presente experimento, para analizar las muestras que se habían expuesto a plasma, las muestras mezcladas de plasma se desproteinaron, y luego se analizaron.

Se prepararon exendina-4 nativa, desamino-histidil-exendina-4 (DA-Exendina-4), beta-hidroxilimidazopropionil-

exendina-4 (HY-exendina-4), beta-carboxi imidazopropionil-exendina-4 (CA-exendina-4), dimetil-histidil-exendina-4 (DM-exendina-4), e imidazoacetil-exendina-4 (CA-exendina-4) a una concentración de 1 mg/ml, respectivamente. Se mezclaron 200 µl de cada derivado de exendina-4 con 200 µl de suero de rata, y la reacción se dejó actuar a 37 °C y un tiempo para cada muestra. Se tomaron 100 µl de cada muestra en cada punto de tiempo de 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 18 h, y 24 h. Se añadieron 400 µl de metanol enfriado en hielo a los 100 µl de la muestra para parar la reacción y a continuación se removió durante 20 seg. Cada mezcla se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante se recogió para los análisis.

Se realizó una HPLC de fase inversa utilizando una concentración creciente de TFA en ACN como fase móvil y utilizando una columna C18.

Los resultados se calcularon por la relación (%) de un área del pico mayor de la exendina-4 con respecto al área del pico total, y el resultado de cada derivado en el punto de tiempo de 0 h se tomó como el 100%, resultando una representación gráfica de un patrón en el que la relación del área del pico mayor descendía a medida que el tiempo aumentaba.

En el punto de tiempo de 24 h, mientras la pureza de la exendina-4 disminuyó aproximadamente un 70%, la pureza de los tres derivados (forma D, H, C) disminuyeron aproximadamente un 77%, 78%, 77%, respectivamente (FIG. 1).

Ejemplo 2. Medición de la actividad *in vitro* de los derivados de exendina-4

Para medir la eficacia de los derivados de la exendina-4 incluyendo la desamino-histidil-exendina-4, se examinó su actividad celular *in vitro*. La exendina-4 nativa y los derivados de exendina-4 se sintetizaron en la American Peptide Corporation. Se aislaron las células de insulinoma o islotes de Langerhans, que se utilizan generalmente para la medición de la actividad *in vitro* del GLP-1, y se analizaron los cambios en la producción de AMPc respecto al tratamiento con GLP-1.

En el presente experimento, se midió la actividad *in vitro* utilizando RIN-m5F (ATCC CRL-11605), que se conoce como una célula de insulinoma de rata y que tiene un receptor GLP-1, por lo que se utiliza generalmente para la medición de la actividad *in vitro* de GLP-1. Las células RIN-m5F se trataron con GLP-1, exendina-4 nativa y derivados de exendina-4 incluyendo Extremo N- α -desamino-histidil-Exendina-4 a distintas concentraciones, y luego se examinó la producción de AMPc debida a los materiales de ensayo para determinar los valores CE₅₀.

[Tabla 1]

Materiales de ensayo	CE ₅₀ (nM)	Relación respecto Exendina-4
Exendina-4	1,21	100
Desamino-histidil (DA)-Exendina-4	0,95	127,4
Dimetil-histidil (DM)- Exendina-4	1,31	92,4
Imidazoacetil (CA)-Exendina-4	1,2	100
Beta-hidroxipropionil (HY)-Exendina-4	1,3	92,4

Ejemplo 3. Medición de la actividad insulínica de los derivados de exendina-4

Se compararon las actividades insulínicas de los derivados de la exendina-4 en las células RINm5F. Las células RINm5F se descongelaron, y se subcultivaron al menos una vez, a continuación se inocularon en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo con un medio de cultivo que contenía FBS (Gibco, artículo nº 11082). Después, se cultivaron las células en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 h. Los medios de cultivo se sustituyeron con medio recién preparado que contenía un 0,5% de FBS, y se incubaron durante 1 h. Tanto la CA-exendina-4 como la exendina-4 (byetta, Amylin) se diluyeron con un medio de cultivo que contenía un 0,5% de FBS y glucosa para alcanzar concentraciones de 10 nM a 0,001 nM. Excepto para las muestras de exendina, se prepararon soluciones diluidas, y se utilizaron como grupo de control. Se eliminaron los medios de cultivo de las células RINm5F, y se añadieron las muestras preparadas a estas, y a continuación se cultivaron en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 1 h. Luego, se recuperaron los medios de cada pocillo. Se utilizó un kit ELISA de insulina de rata (Mercodia) para determinar las concentraciones de insulina de los medios recuperados, y los resultados se muestran en la FIG. 2 y la Tabla 2.

[Tabla 2]

Muestra	Relación de la secreción máx. de insulina respecto al grupo control
CA Exendina-4	83,6%
Exendina-4	43,3%

Como se muestra en la FIG. 2 y la Tabla 2, se descubrió que uno de los derivados de exendina-4, la CA exendina-4,

mostraba una actividad insulínica dos veces más alta que la exendina-4 nativa a la misma concentración

Ejemplo 3. Comparación de la eficacia del derivado de exendina-4 *in vivo*

5 Para medir la eficacia *in vivo* de los derivados de la exendina-4, se midió su efecto sobre la disminución de la glucosa sanguínea en un modelo animal diabético, comparándolo con el de la exendina-4 nativa. Los ratones db/db (Jackson Lab, de 10-12 semanas de edad) se dejaron en ayunas durante 2 horas, y luego se les administró exendina-4 y CA exendina-4 a una cantidad de 0,01 – 1000 mcg/kg, respectivamente. Tras 1 h, se tomaron muestras de sangre de los vasos sanguíneos de la cola para medir los niveles de glucosa sanguínea utilizando un glucómetro. La exendina-4, CA exendina-4, y un vehículo se habían administrado por vía subcutánea, y se calculó el % de cambio de la glucosa sanguínea con respecto al vehículo a cada concentración. Se calculó la DE₅₀ para el efecto sobre la disminución de la glucosa sanguínea utilizando el programa Prism (FIG. 3, Tabla 3).

[Tabla 3]

Muestra	DE ₅₀ (mcg/kg)	R ²
CA Exendina-4	2,30	0,99
Exendina-4	9,92	0,98

Como se muestra en la FIG. 3 y en la Tabla 3, se descubrió que la CA exendina-4 presentaba un efecto sobre la disminución de la glucosa sanguínea aproximadamente 5 veces mayor que la exendina-4 nativa en el modelo animal diabético.

Aplicabilidad Industrial

15 Los derivados peptídicos insulínicos de acuerdo con la presente invención maximizan la actividad insulínica intrínseca de la exendina, es decir, el efecto terapéutico en la diabetes tipo 2, e induce la reducción de la ingesta de alimentos, el retraso en el vaciado gástrico o similares, y es superior a la nativa y otros análogos peptídicos insulínicos. Por lo tanto los derivados peptídicos insulínicos y la composición farmacéutica que comprende los mismos, de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse eficazmente para el tratamiento de las enfermedades.

20 LISTA DE SECUENCIAS

<110> HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> DERIVADO PEPTÍDICO INSULINOTRÓPICO EN EL QUE SE HA MODIFICADO SU AMINOÁCIDO N-TERMINAL

25

<130> OPA08038/EP

<150> KR10-2007-0071071

30

<151> 16-07-2007

<150> US60/991.155

<151> 29-11-2007

35

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

40

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Región X de derivado peptídico insulínico (Fórmula 1), Xaa es un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en Lys, Ser y Arg.

<400> 1

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30
 Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región X de derivado peptídico insulínico (Fórmula 1), Xaa es un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en Lys, Ser y Arg.

<400> 2

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly
 20 25

<210> 3
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región X de derivado peptídico insulínico (Fórmula 1), Xaa es un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en Lys, Ser y Arg.

<400> 3

Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30
 Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 4
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región x' de derivado peptídico insulínico (Fórmula 2), Xaa es un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en Lys, Ser y Arg.

<400> 4

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30
 Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> región x' de derivado peptídico insulínico (Fórmula 2), Xaa es un aminoácido seleccionado de un grupo que consiste en Lys, ser y Arg.

<400> 5

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un derivado peptídico insulínico, en el que el derivado peptídico insulínico consiste en un aminoácido de la siguiente Fórmula 1:



- 5 en la que R1 es 4-imidazoacetil;
R2 es seleccionado de entre el grupo que consiste en $-NH_2$ u $-OH$;
X es

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-

Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-

Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser,

o

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-

Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-

10 Gly;

Y es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg; y
Z es seleccionado de entre el grupo que consiste en Lys, Ser, y Arg.

2. El derivado peptídico insulínico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto histidina N-terminal del péptido insulínico está sustituido por 4-imidazoacetil, y en el que el péptido insulínico es exendina-4.

15 3. El derivado peptídico insulínico como se expone en la reivindicación 1, en el que R1 es 4-imidazoacetil, Y es Lys o Ser, Z es Lys, y R2 es $-NH_2$

4. El derivado peptídico insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como un medicamento.

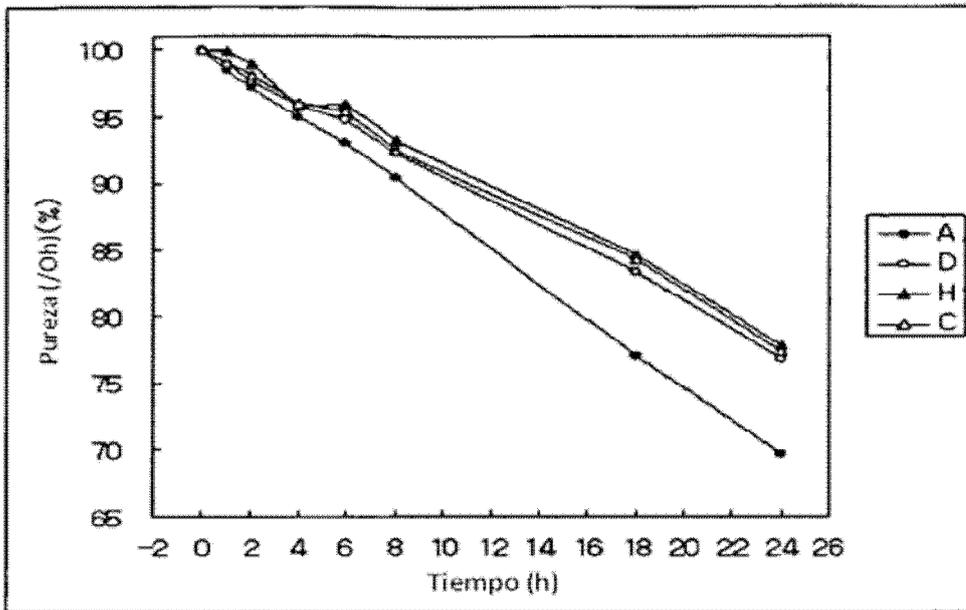
20 5. El derivado peptídico insulínico de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de la diabetes.

6. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes, que comprende el derivado peptídico insulínico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

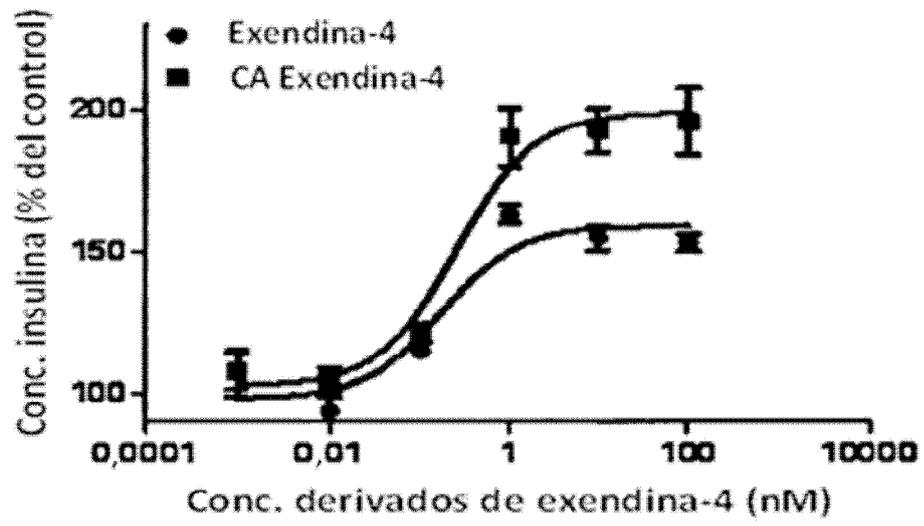
7. El uso del derivado peptídico insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes.

25

[FIG.1]



[FIG.2]



【FIG.3】

