

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 260**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/16** (2006.01)

**A61K 47/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09817101 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2361091**

54 Título: **Ácidos biliares y biguanidas como inhibidores de proteasas para preservar la integridad de los péptidos en el intestino**

30 Prioridad:

**01.10.2008 GB 0817969**

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

**07.05.2015**

73 Titular/es:

**AXCESS LIMITED (100.0%)  
Charter Place 23/75 Seaton Place  
St. Helier Jersey JE1 1JY, GB**

72 Inventor/es:

**NEW, ROGER R. C. y  
TRAVERS, GLEN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 260 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**

Ácidos biliares y biguanidas como inhibidores de proteasas para preservar la integridad de los péptidos en el intestino

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a métodos de preservación de la integridad de los péptidos en el intestino. En particular, se refiere al nuevo uso de ciertos compuestos como inhibidores de las serina proteasas.

**Antecedentes de la técnica**

- 10 La siguiente descripción de la técnica anterior solamente pretende facilitar la comprensión de la presente invención. La descripción no es un reconocimiento ni una admisión de que los materiales a los que se hace referencia formen o hayan formado parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de la solicitud.

- 15 Los péptidos y, en particular, los polipéptidos tales como las proteínas, van cobrando cada vez un mayor reconocimiento como agentes deseables para el tratamiento de enfermedades que se manifiestan en el intestino (tracto gastrointestinal). Las proteínas terapéuticas a menudo se basan en productos naturales con una larga historia de uso medicinal, que tienen un perfil de seguridad superior al de las pequeñas moléculas recién sintetizadas y cuyos efectos en el organismo son, en gran medida, desconocidos. Además, las proteínas pueden presentar un elevado grado de especificidad y selectividad, y al mismo tiempo, se pueden diseñar para sacar partido de su gran tamaño para mostrar multifuncionalidad, lo que les permite interactuar simultáneamente con dos o más dianas diferentes.

- 20 Las proteínas con actividad antioxidante, tales como la superóxido dismutasa, son ejemplos de dichas aplicaciones terapéuticas. Otros ejemplos son los anticuerpos monoclonales, que pueden actuar como agentes antiinfecciosos mediante la unión a sitios de los organismos infecciosos que invaden el intestino. Como alternativa, dichos anticuerpos se pueden unir a sitios receptores de las células intestinales, e interferir con los procesos de adhesión y con la colonización de los organismos infecciosos. Además, estos anticuerpos pueden interactuar con las células del sistema inmunológico para estimular su actividad en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Otros tipos de péptidos terapéuticos incluyen hormonas peptídicas, tales como los agentes de supresión del apetito.

- 25 Un inconveniente importante para el uso de los péptidos en el intestino es su extrema sensibilidad a las proteasas intestinales. Estas proteasas se pueden encontrar tanto en el estómago (por ejemplo, la pepsina), como en el intestino superior, y han evolucionado para permitir que el tracto digestivo pueda descomponer los péptidos ingeridos como alimentos, por proteólisis, en aminoácidos que se pueden absorber como nutrientes por mecanismos mediados por receptores.

- 30 Si el sitio de acción deseado de un péptido terapéutico o profiláctico es el intestino delgado, se puede proteger el péptido de la degradación en el estómago colocándolo dentro de una cápsula con recubrimiento entérico, comprimido u otro dispositivo que resista la disolución al pH bajo encontrado en el estómago, pero que se desintegre a un pH superior, liberando el péptido en el intestino delgado, por ejemplo, en el duodeno, yeyuno o íleon. Sin embargo, la acción de las proteasas que se encuentran en el intestino delgado (en particular, las serina proteasas, la tripsina, la quimotripsina, la elastasa y la carboxipeptidasa) es tal que se pueden descomponer rápidamente y destruir los péptidos una vez que se han liberado de un dispositivo de este tipo. Esto limita claramente la eficacia de los péptidos terapéuticos administrados por vía oral, y un medio de prevenir su degradación por proteasas mejoraría notablemente su rendimiento.

- 40 Aunque hay muchos agentes que actúan como inhibidores de la proteasa que son conocidos para los expertos en la materia, son pocos, si es que hay alguno, los apropiados para esta aplicación en concreto. Los inhibidores más conocidos, por ejemplo, la antipaína y la leupeptina, se usan meramente con fines de investigación, y no son aceptables para la administración humana. Algunos inhibidores, por ejemplo, el fluorofosfato de diisopropilo o el fluoruro de fenilmetilsulfonilo tienen un alto grado de potencia, pero muestran una especificidad muy amplia, por lo que existe el riesgo de que ejerzan su acción en partes no deseadas del organismo, además del intestino. Por otro lado, otros inhibidores tales como la nueva clase de inhibidores de la proteasa empleados en el tratamiento del VIH son tan selectivos en la naturaleza de las proteasas que inhiben que no tienen efecto sobre las serina proteasas del intestino. Dos inhibidores de la serina proteasa que se han administrado a los seres humanos son la aprotinina y el inhibidor de la tripsina de soja. Sin embargo, estos son relativamente caros de sintetizar y se tendrían que incluir en un medicamento a niveles tan elevados que el coste del producto final no permitiría la fabricación de un medicamento para un uso diario habitual.

- 50 La presente invención trata de abordar o al menos mejorar uno o más de los problemas asociados con los dispositivos de la técnica anterior.

## Descripción de la invención

Los inventores han descubierto que ciertos compuestos, cuya interacción con las proteasas intestinales no se había reconocido previamente, sorprendentemente, inhiben las serina proteasas. Esto permite su uso para proteger los péptidos de la proteólisis (es decir, la degradación realizada por las serina proteasas). Los compuestos identificados como aquellos que tienen esta actividad son biguanidas, ciertos ácidos biliares y sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona los siguientes (1) a (6).

(1) Un compuesto para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad del cuerpo humano o animal mediante terapia, método (i) en el que el cuerpo humano o animal se trata mediante la administración de uno o más péptidos terapéuticos en el intestino; y (ii) dicho compuesto se administra en el intestino para inhibir la degradación de dichos uno o más péptidos por una o más serina proteasas, en el que dicho compuesto es un ácido biliar o una biguanida, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho ácido biliar o dicha biguanida, en el que dicho ácido biliar se selecciona entre ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido glucoquenodesoxicólico y ácido glucodesoxicólico, y en el que dicha biguanida es metformina o fenformina, en el que dicho uno o más péptidos terapéuticos se seleccionan entre insulina, calcitonina, hormona del crecimiento, factores de liberación de hormonas del crecimiento, galanina, hormona paratiroidea, péptido YY, oxintomodulina, eritropoyetinas, factores de estimulación de colonias, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformantes, GLP-1, GLP-2, exendina, leptina, factores neurotróficos, factores de crecimiento de tipo insulina, factores inductores del cartílago, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, interferón- $\gamma$ , interferón- $\lambda$ , interferón- $\alpha$ , y conjugados de cualquiera de los anteriores.

(2) Un compuesto de acuerdo con la reivindicación (1) para su uso según lo definido en (1), en el que el compuesto se selecciona entre ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido glucoquenodesoxicólico, ácido glucodesoxicólico o sal farmacéuticamente aceptable de estos compuestos.

(3) Un compuesto de acuerdo con (1) para su uso según lo definido en (1), en el que el compuesto es ácido quenodesoxicólico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(4) Un compuesto de acuerdo con (1) para su uso según lo definido en (1), en el que el compuesto es metformina o fenformina o una sal farmacéuticamente aceptable de metformina o fenformina.

(5) Un compuesto de acuerdo con (1) para su uso según lo definido en (1), en el que el compuesto es metformina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

(6) Un producto o una composición farmacéutica que contiene: (a) un compuesto según lo definido en uno cualquiera de (1) a (5); y (b) un péptido o polipéptido; en el que (a) y (b) se preparan para la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto, en el que dicho péptido o polipéptido se va a disponer en el intestino para su uso en el tratamiento mediante terapia de una enfermedad o afección que afecta al sujeto o para su uso en la prevención de una enfermedad o afección que afecta al sujeto, y en el que dicho compuesto es para su uso como un inhibidor de la degradación de dicho péptido o polipéptido por una o más serina proteasas, y en el que dicho péptido o polipéptido se selecciona entre los péptidos definidos en (1).

El mecanismo mediante el cual los compuestos para su uso de acuerdo con la invención inhiben las serina proteasas es específico de la estructura, presumiblemente el resultado de una interacción de unión directa entre los compuestos y los sitios receptores de las proteasas. Evidencia de ello es el hecho de que otros ácidos biliares tales como el ácido cólico, ácido taurocólico y ácido taurodesoxicólico no tienen este efecto inhibidor (véanse las Figuras 5 y 6). Así pues, aunque el efecto inhibidor se manifieste a concentraciones relativamente altas de ácido biliar, biguanida o derivado de los mismos, se pueden descartar las rutas inespecíficas de la inhibición basadas, por ejemplo, en las interacciones de tensioactivos o un cambio en el pH. En las condiciones apropiadas, la inhibición de la actividad de la proteasa puede ser de 100 %.

La actividad inhibidora se puede demostrar usando sustratos peptídicos fluorogénicos o cromogénicos. Se han observado efectos inhibidores con una selección de diferentes sustratos peptídicos, lo que indica que el efecto no se debe a una interacción específica entre el sustrato peptídico y el inhibidor.

Como se ha indicado anteriormente, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención son para su uso como inhibidores de una o más serina proteasas. El término "intestino", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa tracto gastrointestinal, y preferentemente significa intestino delgado, tal como el duodeno, yeyuno o íleon.

Preferentemente, las serina proteasas son pequeñas proteasas intestinales, es decir, proteasas que se encuentran en el intestino delgado. Dichas serina proteasas se pueden seleccionar entre tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa y combinaciones de las mismas. El compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención es para su uso en la inhibición de la proteólisis de un péptido en el intestino por dichas una o más serina proteasas.

Cuando el compuesto de la presente invención es un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferentemente es quenodesoxicolato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 Cuando se hace referencia a las sales farmacéuticamente aceptables de los ácidos biliares, se puede usar cualquier ión cargado positivamente farmacéuticamente aceptable apropiado. Por lo general, se usa un metal alcalino tal como sodio o potasio. Se pueden usar contraiones alternativos, por ejemplo, un ión de amonio, aunque esto es menos preferido. Cuando el compuesto de la presente invención es un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, normalmente, se prefiere usar la sal frente al ácido, aunque, en cualquiera de los casos, se forma la misma especie aniónica en el intestino; que la sal o su ácido conjugado esté presente depende del pH del medio.
- 10 Cuando el compuesto de la presente invención es una biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, la biguanida es metformina o fenformina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. Es adecuado que las sales farmacéuticamente aceptables sean cloruro, bromuro, yoduro o sales de ácidos orgánicos tales como acetato, propionato, mesilato (metilsulfonato) o glucuronato.
- 15 La presente divulgación se refiere a un método de inhibición de una o más serina proteasas, que normalmente es un método de inhibición de la proteólisis de un péptido en el intestino por una o más serina proteasas, método que comprende administrar a un sujeto un compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención.
- 20 En general, la presente invención se refiere al tratamiento de seres humanos, por ejemplo, cuando se menciona el "intestino", por lo general, se refiere al intestino humano, aunque en un aspecto, la invención se refiere al tratamiento de animales no humanos. Por consiguiente, el sujeto en el que la presente invención puede encontrar utilidad específica incluye, a modo de ejemplo: seres humanos, mamíferos, animales de compañía y aves.
- 25 La presente divulgación se refiere a un producto que contiene (a) un compuesto de la presente invención como se define en el presente documento; y (b) un péptido, en el que (a) y (b) se preparan para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección.
- 30 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención junto con un péptido (cuya proteólisis se va a inhibir mediante dicho compuesto). Por lo general, la concentración de dicho compuesto en la composición es de al menos 20 mg/ml. En general, es de 100 mg/ml o inferior. La concentración del péptido depende obviamente de la naturaleza y del efecto deseado del péptido, así como de la edad, del tamaño y de los antecedentes médicos del paciente.
- 35 Cuando el compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención como se ha definido anteriormente es un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, su concentración en la composición es preferentemente de 20-100 mg/ml. Además, el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden estar presentes en la composición en una cantidad de al menos 50 % en peso, preferentemente de 60 a 95 %, y más preferentemente de 80 a 90 %.
- 40 La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende:
- (i) un péptido o un polipéptido; y
  - (ii) un compuesto seleccionado entre ácido ursodesoxicólico, glucoquenodesoxicolato, glucodesoxicolato y sus sales farmacéuticamente aceptables,
- 45 en la que dicho compuesto está presente en la composición a una concentración de 20 a 100 mg/ml. Aunque los ácidos biliares y sus derivados en el componente (ii) son conocidos, no se han usado previamente a altas concentraciones.
- 50 La divulgación se refiere al uso de: (i) un péptido o un polipéptido; y (ii) una sal biliar o sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se ha definido anteriormente, en la fabricación de un medicamento, en el que dicha sal biliar o sal farmacéuticamente aceptable de la misma está presente en la composición a una concentración de 20 a 100 mg/ml, y la composición se formula para administrarla a través del tracto intestinal.
- En este sentido, la sal biliar es preferentemente una o más de entre ácido ursodesoxicólico, glucoquenodesoxicolato, glucodesoxicolato y sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 55 Cuando el compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención como se ha definido anteriormente es una biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, su concentración es preferentemente de 20-100 mg/ml. Además, la biguanida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede estar presente en la composición en una cantidad de al menos 50 % en peso, preferentemente de 60 a 95 % y más preferentemente de 80 a 90 %.
- 60 La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende:
- (i) un péptido o un polipéptido; y
  - (ii) un compuesto seleccionado entre metformina o fenformina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas,
- en la que dicho compuesto está presente en la composición a una concentración de 20 a 100 mg/ml.

La divulgación también se refiere al uso de: (i) un péptido o un polipéptido; y (ii) una biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se ha definido anteriormente, en la fabricación de un medicamento, en el que dicha biguanida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma está presente en la composición a una concentración de 20 a 100 mg/ml y la composición se formula para la administración a través del tracto intestinal.

5 Normalmente, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención es adecuada para la administración oral. En esta realización, para usar satisfactoriamente un compuesto para su uso de acuerdo con la invención para proteger un péptido frente a la degradación por las serina proteasas, es deseable administrar el compuesto para su uso de acuerdo con la invención junto con el péptido dentro de un vehículo que permita el paso a través del estómago intacto. Dicho vehículo puede ser un comprimido, una cápsula o un microgránulo, recubiertos, si es necesario, con una película entérica resistente a la disolución en las condiciones encontradas en el estómago, pero que es capaz de descomponerse y liberar su contenido en el intestino delgado. Cuando la composición se formula en forma de comprimidos, pueden estar sin recubrir o recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto intestinal, y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Se puede emplear, por ejemplo, un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención que son adecuadas para la administración oral se recubren preferentemente con un recubrimiento entérico que se vuelve permeable a un pH de 3 a 7. Más preferentemente, el recubrimiento se vuelve permeable a un pH de 4 a 6,5, y lo más preferentemente de 5 a 6. Los recubrimientos entéricos adecuados son conocidos en la técnica. Los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención normalmente se formulan con dicho recubrimiento entérico.

Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender otros excipientes farmacéuticos convencionales mezclados para proporcionar una composición en forma de un polvo, un líquido, un gel, una pasta, una cera o una suspensión. Por ejemplo, también se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas excipientes farmacéuticos capaces de mejorar la disolución del compuesto de la invención o el péptido, o que actúen como antioxidantes, conservantes, agentes de deslizamiento (por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco), agentes de hinchamiento, disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz o ácido alginico), agentes aglutinantes, (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia), etc.

Como se usa en el presente documento, el término péptido se refiere a una amida que se puede obtener a partir de dos o más moléculas de ácido aminocarboxílico, que pueden ser iguales o diferentes, mediante la formación de un enlace covalente desde el carbono de carbonilo de una al átomo de nitrógeno de la otra con pérdida formal de agua. Las moléculas de aminoácido pueden ser de forma *D* o *L*. Por lo general, los péptidos se pueden obtener a partir de ácidos  $\alpha$ -amino, pero también pueden obtenerse a partir de ácidos no  $\alpha$ -amino o una mezcla de ácidos  $\alpha$ -amino y no  $\alpha$ -amino. Preferentemente, los péptidos se pueden obtener a partir de aminoácidos naturales. En un aspecto, los aminoácidos se pueden obtener o se obtienen mediante la modificación química de aminoácidos naturales una vez sintetizado el péptido.

En una realización, los péptidos son polipéptidos, es decir, péptidos con 10 o más restos de aminoácido. En un aspecto preferido de esta realización, el polipéptido es una proteína. En otra realización, el péptido tiene de 2 a 9 restos de aminoácido.

Los péptidos y polipéptidos que tienen una aplicación particular en la invención se pueden obtener de fuentes humanas, vegetales, animales, bacterianas o fúngicas, y bien se extraen de fuentes naturales, se preparan como recombinantes por fermentación o se sintetizan químicamente.

Como los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención inhiben la proteólisis, lo que implica la descomposición de los enlaces peptídicos, se pueden usar para inhibir la proteólisis de cualquier péptido. Sin embargo, el péptido debería poder tener un efecto beneficioso cuando se disponga en el intestino. El efecto beneficioso puede ser, por ejemplo, terapéutico o preventivo, tal como profiláctico. El péptido puede ser de origen natural (biológico), sintético o semisintético.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante la preparación de una mezcla sustancialmente anhidra que contenga el péptido y el compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención. Dependiendo de la formulación deseada de la composición, puede ser apropiado llenar cápsulas no recubiertas con la mezcla y luego recubrir las cápsulas con una mezcla polimérica apropiada para conseguir determinadas propiedades de permeabilidad. Dependiendo de la naturaleza de los excipientes adicionales empleados, la composición farmacéutica de la invención puede estar en forma líquida, sólida, semisólida o de gel.

#### Información general

La invención también incluye todas las etapas y características referidas o indicadas en la memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones, o dos cualquiera o más de las etapas o características.

A lo largo de presente memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que el término "comprender" o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros, pero no la exclusión de ningún otro número entero ni grupo de números enteros. También se observa que, en la presente divulgación, y en particular en las reivindicaciones y/o los párrafos, el término tal como "comprende", y las expresiones tales como "compuesto por", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, se refieren a elementos no citados explícitamente, pero excluyen los elementos que se encuentran en la técnica anterior, o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Por otra parte, a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "incluyen" o las variaciones tales como "incluye" o "que incluye", se entenderá que implican la inclusión de un número entero citado o grupo de números enteros citados.

En la descripción de la invención, se pueden encontrar otras definiciones de términos seleccionados usados en el presente documento, y se aplican a lo largo de la misma. A menos que se defina lo contrario, el resto de términos técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por cualquier experto habitual en la materia a la que pertenece la invención.

### Breve descripción de las figuras

A continuación, se describirán aspectos de la invención solamente a modo de ejemplo, con referencia a la siguiente descripción y figuras.

La Figura 1 ilustra la inhibición de la tripsina por el quenodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es quenodesoxicolato de HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina a 100 mg/ml.

La Figura 2 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por el quenodesoxicolato. Se presenta una curva de dosis-respuesta del sustrato peptídico HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina, en la que el tiempo de incubación es de 20 minutos.

La Figura 3 ilustra la inhibición de la quimotripsina por el quenodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es quenodesoxicolato de glutaril-L-fenilalanina-4-metil-7-cumarinilamida a una concentración de 100 mg/ml.

La Figura 4 ilustra la inhibición de la actividad de la quimotripsina por el quenodesoxicolato. Se presenta una curva de dosis-respuesta del sustrato peptídico glutaril-L-fenilalanina-4-metil-7-cumarinilamida durante un tiempo de incubación de 20 minutos.

La Figura 5 ilustra la inhibición de la tripsina por desoxicolato (ejemplo comparativo) en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es desoxicolato de HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina a una concentración de 25 mg/ml.

La Figura 6 ilustra la inhibición de la quimotripsina por desoxicolato (ejemplo comparativo) en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es sal biliar de glutaril-L-fenilalanina-4-metil-7-cumarinilamida a una concentración de 25 mg/ml.

La Figura 7 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por ursodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es sal biliar de HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina a una concentración de 25 mg/ml.

La Figura 8 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por ursodesoxicolato. Se presenta una curva de dosis-respuesta del sustrato peptídico HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina con un tiempo de incubación de 20 minutos.

La Figura 9 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por glucodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es sal biliar de HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina a una concentración de 25 mg/ml.

La Figura 10 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por el glucoquenodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

La Figura 11 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por el glucocolato (ejemplo comparativo) en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

La Figura 12 ilustra la inhibición de la actividad de la quimotripsina por el quenodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es HCl de Boc- $\beta$ -bencil-Asp-Pro-Arg-7-amido-4-metilcumarina y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

5 La Figura 13 ilustra la inhibición de la actividad de la trombina por el quenodesoxicolato en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es clorhidrato de *N*-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

La Figura 14 ilustra la inhibición de la actividad de la trombina por el desoxicolato (ejemplo comparativo) en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es clorhidrato de *N*-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

10 La Figura 15 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por la metformina en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es HCl de Z-L-Arg-7-amido-4-metilcumarina y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

La Figura 16 ilustra la inhibición de la actividad de la tripsina por la fenformina en una reacción de evolución en el tiempo en la que el sustrato peptídico es Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida y el tiempo de incubación es de 20 minutos.

### 15 Realizaciones ilustrativas de la invención

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes. En los Ejemplos 1-9, 12 y 13, se evaluó el progreso de la reacción enzimática midiendo la aparición de producto de reacción (amino-4-metil-cumarina) fluorimétricamente usando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm (435 nm de corte) en una máquina Spectramax Gemini XS de Molecular Devices.

#### 20 Ejemplo 1

Se disolvió tripsina, de páncreas bovino, en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a una concentración de 0,02 mg/ml. Se disolvió el sustrato Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida en HBSS a una concentración de 0,01 mg/ml, y se disolvió quenodesoxicolato de sodio a un intervalo de concentraciones a partir de 100 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas negras de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 20:1 de solución enzimática y 60:1 de sal biliar entre sí, y luego se añadió 20:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a temperatura ambiente durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. En la Figura 1, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del quenodesoxicolato a lo largo del tiempo, y en la Figura 2, se muestra una curva de dosis-respuesta con quenodesoxicolato a diferentes concentraciones.

#### 30 Ejemplo 2

Se repitió el Ejemplo 1, pero con quimotripsina como proteasa (en lugar de la tripsina) y con glutaril-L-fenilalanina-4-metil-7-cumarinilamida como sustrato.

35 En la Figura 3, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del quenodesoxicolato a lo largo del tiempo, y en la Figura 4, se muestra una curva de dosis-respuesta con quenodesoxicolato a diferentes concentraciones.

#### Ejemplo 3

40 Se repitió el Ejemplo 1, pero con desoxicolato de sodio (ejemplo comparativo) en lugar de quenodesoxicolato de sodio. En la Figura 5, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del desoxicolato a lo largo del tiempo. Como ejemplos comparativos adicionales, la Figura 5 también incluye los resultados obtenidos al usar colato, taurocolato y taurodesoxicolato en lugar de desoxicolato, lo que demuestra que estos tres compuestos no inhiben la tripsina.

#### Ejemplo 4

45 Se repitió el Ejemplo 2, pero con desoxicolato de sodio (ejemplo comparativo) en lugar de quenodesoxicolato de sodio. En la Figura 6, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del desoxicolato a lo largo del tiempo. Como ejemplos comparativos adicionales, la Figura 6 también incluye los resultados obtenidos al usar colato y taurocolato en lugar de desoxicolato, lo que demuestra que estos dos compuestos no inhiben la quimotripsina.

#### Ejemplo 5

50 Se disolvió tripsina, de páncreas bovino, en HBSS a una concentración de 0,02 mg/ml. Se disolvió el sustrato Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida en HBSS a una concentración de 0,01 mg/ml, y se disolvió ursodesoxicolato de sodio a un intervalo de concentraciones a partir de 50 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas negras de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 20:1 de solución enzimática y 100:1 de sal biliar entre sí,

y luego se añadió 20:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a 37 °C durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. En la Figura 7, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del ursodesoxicolato a lo largo del tiempo, y en la Figura 8, se muestra una curva de dosis-respuesta con ursodesoxicolato a diferentes concentraciones.

#### 5 Ejemplo 6

Se disolvió tripsina, de páncreas bovino, en HBSS a una concentración de 0,02 mg/ml. Se disolvió el sustrato Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida en HBSS a una concentración de 0,01 mg/ml, y se disolvió glucodesoxicolato de sodio a un intervalo de concentraciones a partir de 100 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas negras de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 20:1 de solución enzimática y 100:1 de sal biliar entre sí, y luego se añadió 20:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a 37 °C durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. En la Figura 9, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del glucodesoxicolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 7

Se repitió el Ejemplo 5, pero con glucoquenodesoxicolato de sodio en lugar de ursodesoxicolato de sodio. En la Figura 10, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del glucoquenodesoxicolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 8

Se repitió el Ejemplo 6, pero con glucocolato de sodio (ejemplo comparativo) en lugar de glucodesoxicolato de sodio. En la Figura 11, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del glucocolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 9

Se disolvió quimotripsina, de páncreas bovino, en HBSS a una concentración de 0,02 mg/ml. Se disolvió el sustrato Boc- $\beta$ -bencil-Asp-Pro-Arg-7-amido-4-metilcumarina en HBSS a una concentración de 0,01 mg/ml, y se disolvió quenodesoxicolato de sodio a 100 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas transparentes de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 20:1 de solución enzimática y 60:1 de sal biliar entre sí, y luego se añadió 20:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a 37 °C durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. En la Figura 12, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del quenodesoxicolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 10

Se disolvió trombina, de páncreas bovino, en HBSS a una concentración de 0,5 mg/ml. Se disolvió el sustrato clorhidrato de N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida en HBSS a una concentración de 0,5 mg/ml, y se disolvió quenodesoxicolato de sodio a un intervalo de concentraciones a partir de 100 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas transparentes de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 50:1 de solución enzimática y 100:1 de sal biliar entre sí, y luego se añadió 50:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a 37 °C durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. Se evaluó el progreso de la reacción enzimática midiendo la aparición de producto de reacción (*p*-nitroanilina) colorimétricamente usando una longitud de onda de 405 nm en un lector Anthos 2001 de Anthos Labtec Instruments. En la Figura 13, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del quenodesoxicolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 11

Se repitió el Ejemplo 10, pero con desoxicolato de sodio (ejemplo comparativo) en lugar de quenodesoxicolato de sodio. En la Figura 14, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte del desoxicolato a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 12

Se repitió el Ejemplo 9, pero con tripsina (en lugar de quimotripsina) de plasma bovino, Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida como sustrato y metformina como inhibidor. En la Figura 15, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte de la metformina a lo largo del tiempo.

#### Ejemplo 13

Se disolvió tripsina, de páncreas bovino, en HBSS a una concentración de 0,02 mg/ml. Se disolvió el sustrato Z-L-arginina-4-metil-7-cumarinilamida en HBSS a una concentración de 0,01 mg/ml, y se disolvió fenformina a 100 mg/ml. El ensayo se realizó en los pocillos de microplacas negras de plástico de 96 pocillos, en los que se mezclaron 20:1 de solución enzimática y 100:1 de sal biliar entre sí, y luego se añadió 20:1 de sustrato, con mezclado al inicio de la reacción, que procedió a 37 °C durante hasta 30 minutos, con la medición en varios puntos de tiempo intermedios. En la Figura 16, se muestra la inhibición de la actividad enzimática por parte de la fenformina a lo largo del tiempo.



**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto para uso en un método de tratamiento de una enfermedad del cuerpo humano o animal por terapia, en cuyo método (i) el cuerpo humano o animal se trata administrando uno o más péptidos terapéuticos en el intestino; y (ii) dicho compuesto se administra en el intestino para inhibir la degradación de dichos uno o más péptidos por una o más serina proteasas,
- 5 en el que dicho compuesto es un ácido biliar o una biguanida, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho ácido biliar o dicha biguanida, en el que dicho ácido biliar se selecciona entre ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido glucoquenodesoxicólico y ácido glucodesoxicólico, y en el que dicha biguanida es metformina o fenformina,
- 10 en el que dicho uno o más péptidos terapéuticos se seleccionan de insulina, calcitonina, hormona del crecimiento, factores de liberación de hormonas del crecimiento, galanina, hormona paratiroidea, péptido YY, oxintomodulina, eritropoyetinas, factores de estimulación de colonias, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformantes, GLP-1, GLP-2, exendina, leptina, factores neurotróficos, factores de crecimiento de tipo insulina, factores inductores del cartílago, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, interferón-gamma, interferón-la,
- 15 interferones alfa, y conjugados de cualquiera de los anteriores.
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para un uso según lo definido en la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido glucoquenodesoxicólico, ácido glucodesoxicólico o sal farmacéuticamente aceptable de estos compuestos.
- 20 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para un uso según lo definido en la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido quenodesoxicólico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para un uso según lo definido en la reivindicación 1, en el que el compuesto es metformina o fenformina, o una sal farmacéuticamente aceptable de metformina o fenformina.
- 25 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para un uso según lo definido en la reivindicación 1, en el que el compuesto es metformina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
6. Un producto o una composición farmacéutica que contiene: (a) un compuesto según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y (b) un péptido o polipéptido; en el que (a) y (b) se preparan para administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto, en el que dicho péptido o polipéptido se va a disponer en el intestino para su uso en el tratamiento por terapia de una enfermedad o afección que afecta al sujeto, o para su uso en la
- 30 prevención de una enfermedad o afección que afecta al sujeto, y en el que dicho compuesto es para su uso como un inhibidor de la degradación de dicho péptido o polipéptido por una o más serina proteasas, y en el que dicho péptido o polipéptido se selecciona entre los péptidos definidos en la reivindicación 1.

Figura 1

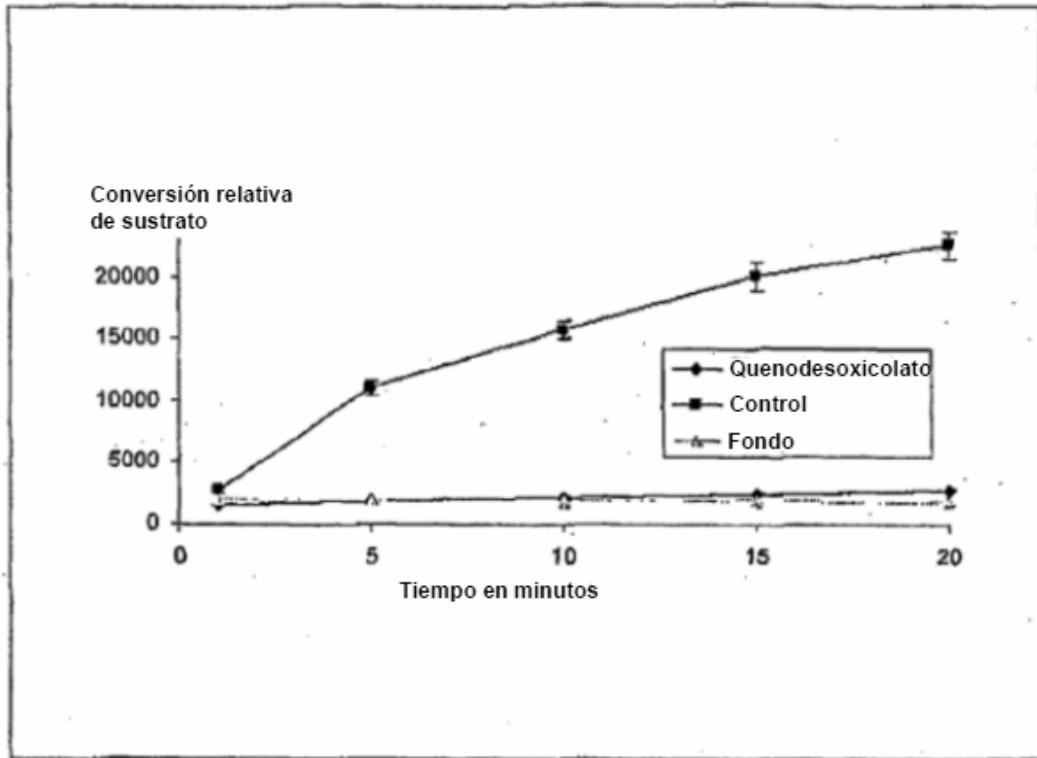


Figura 2

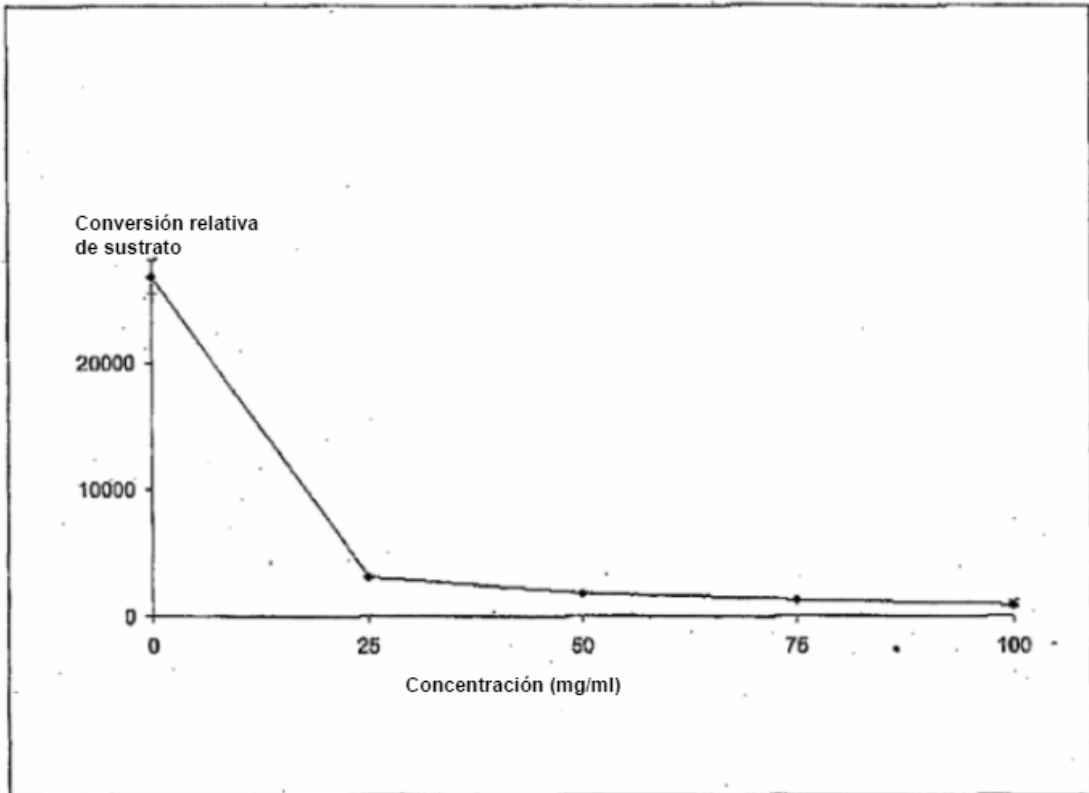


Figura 3

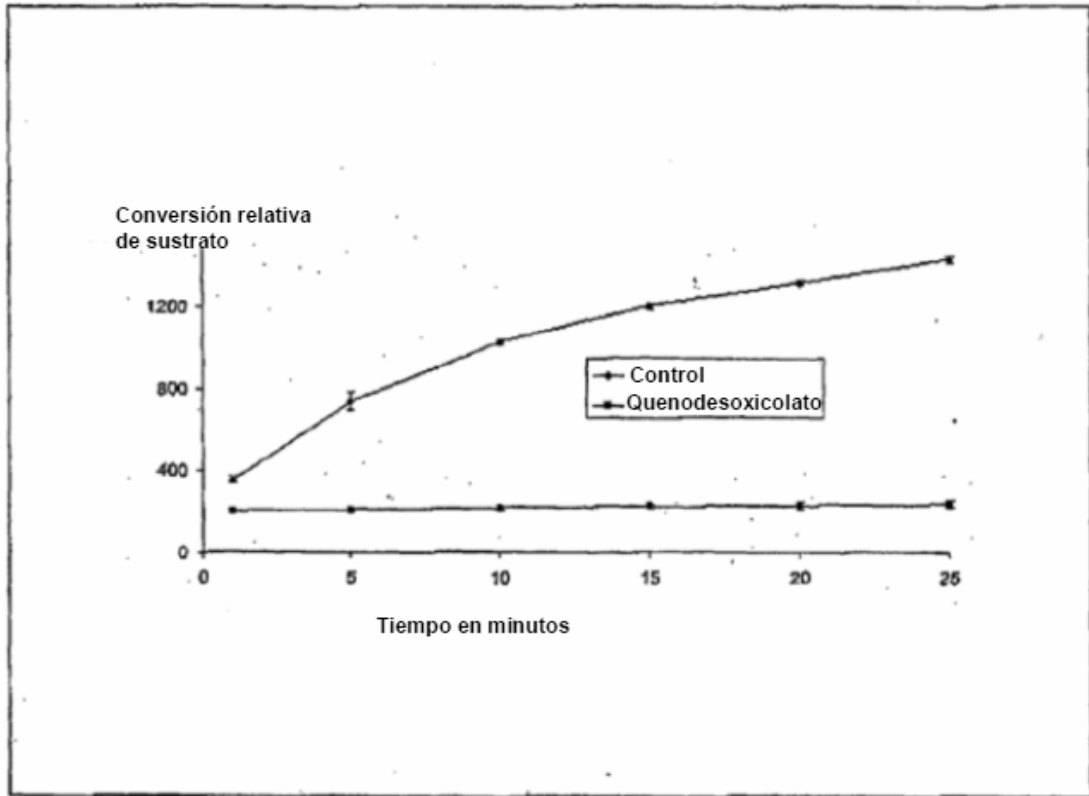


Figura 4

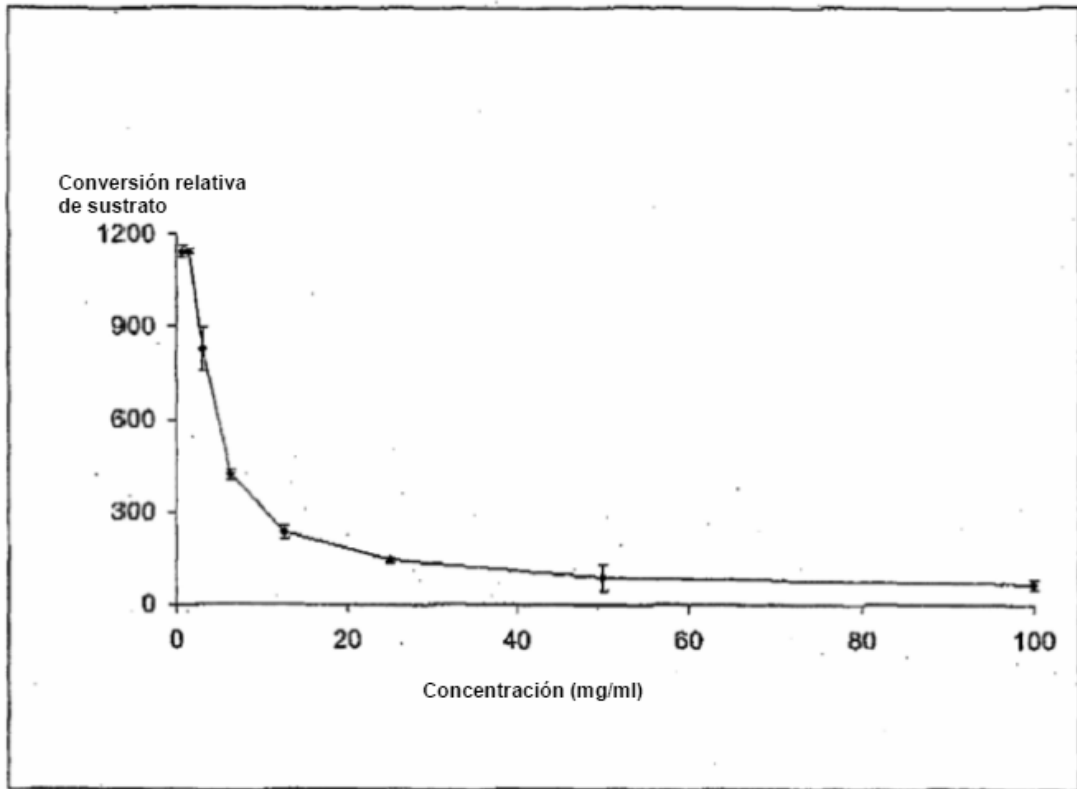


Figura 5

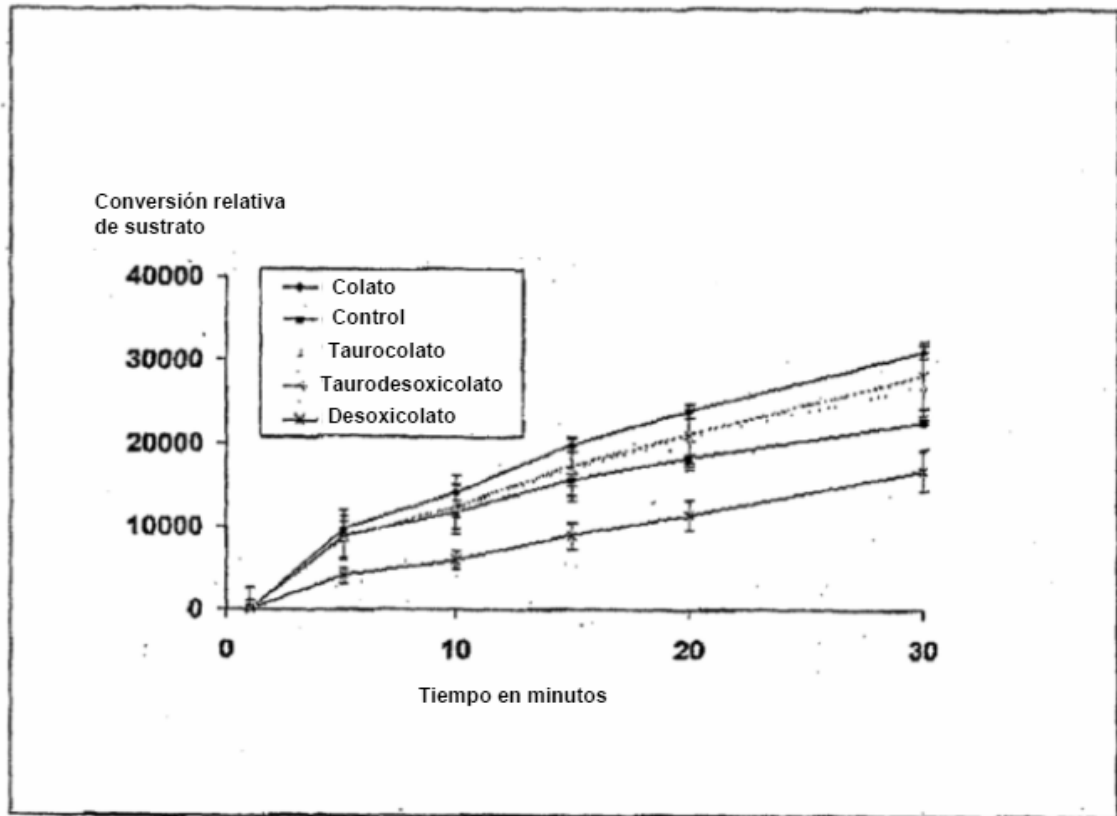


Figura 6

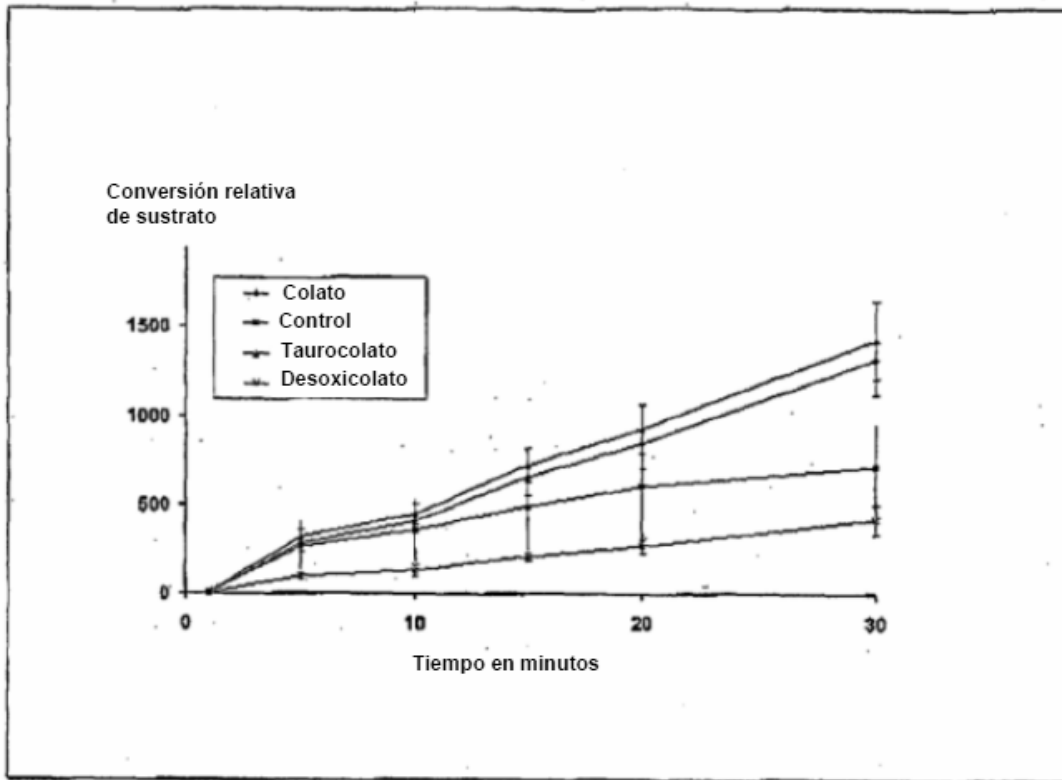


Figura 7

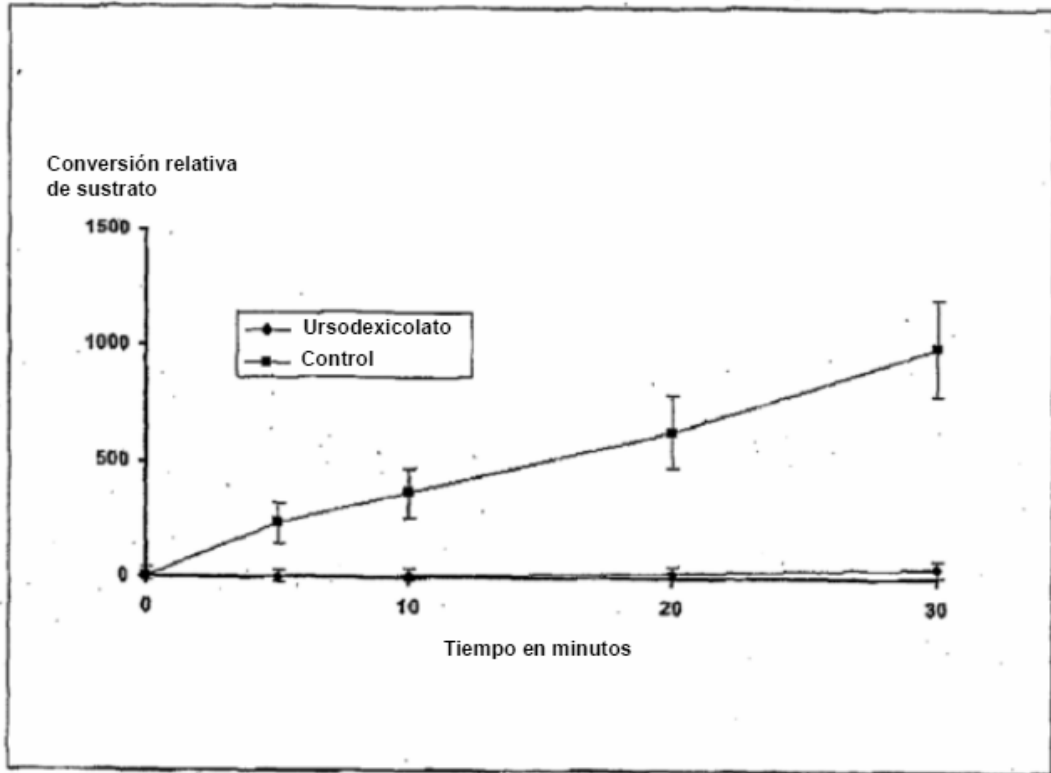




Figura 8

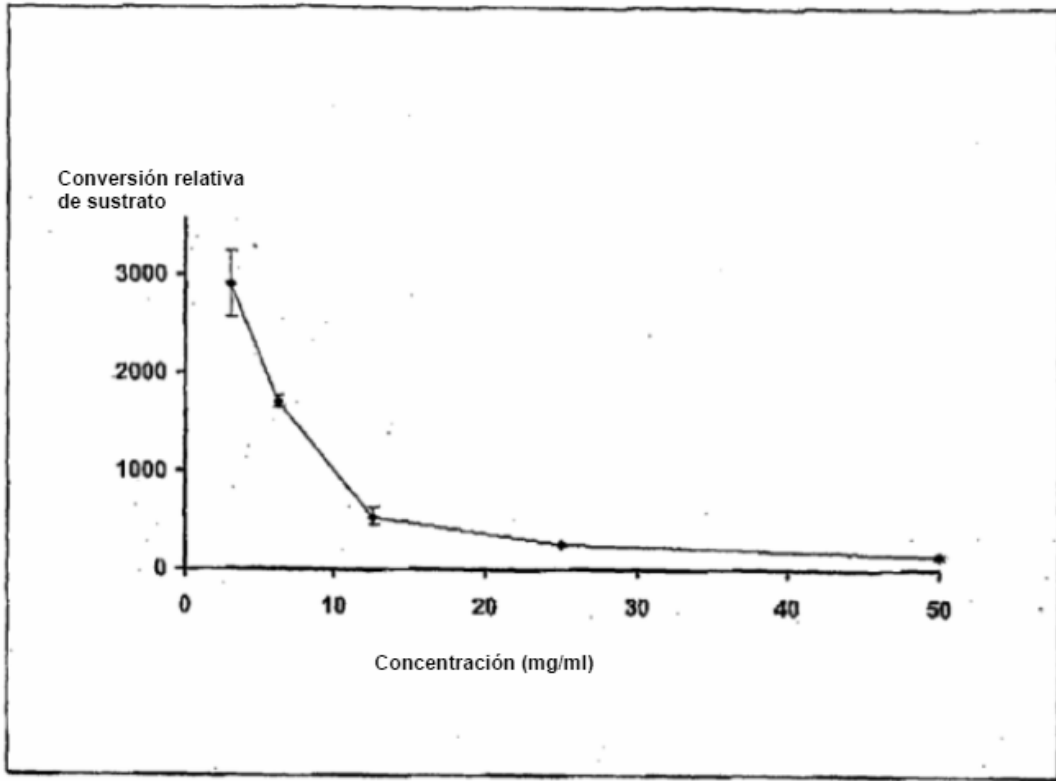


Figura 9

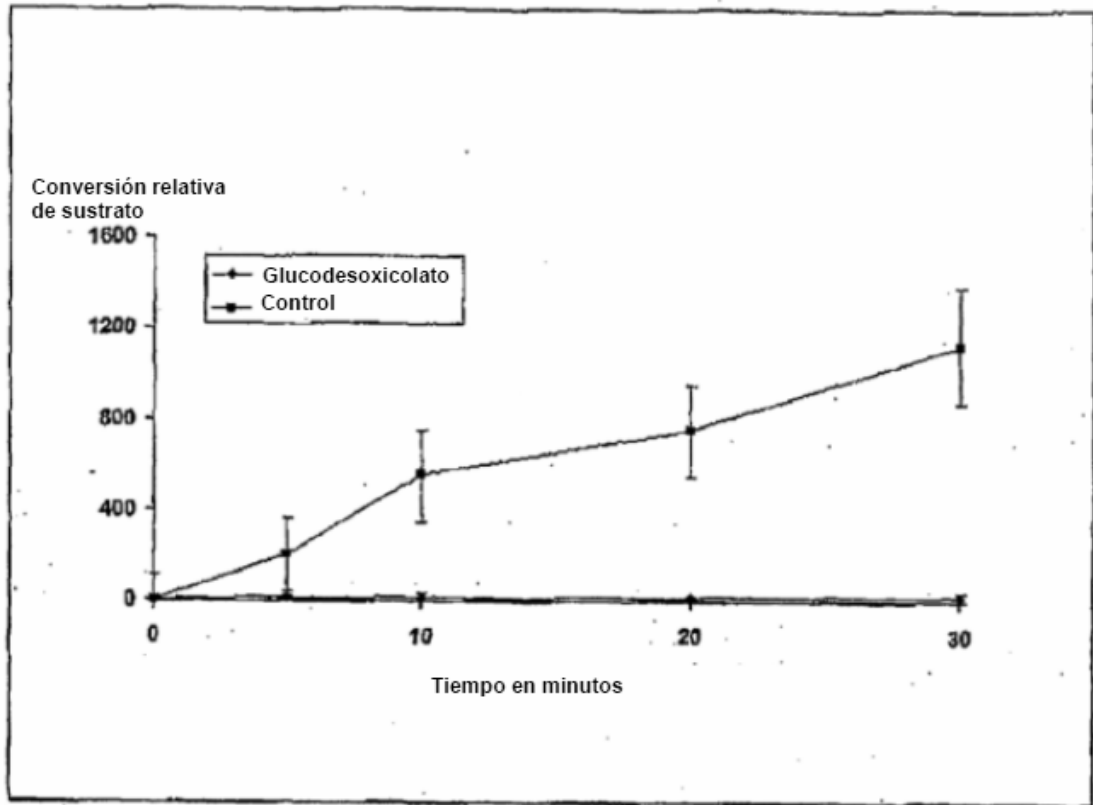


Figura 10

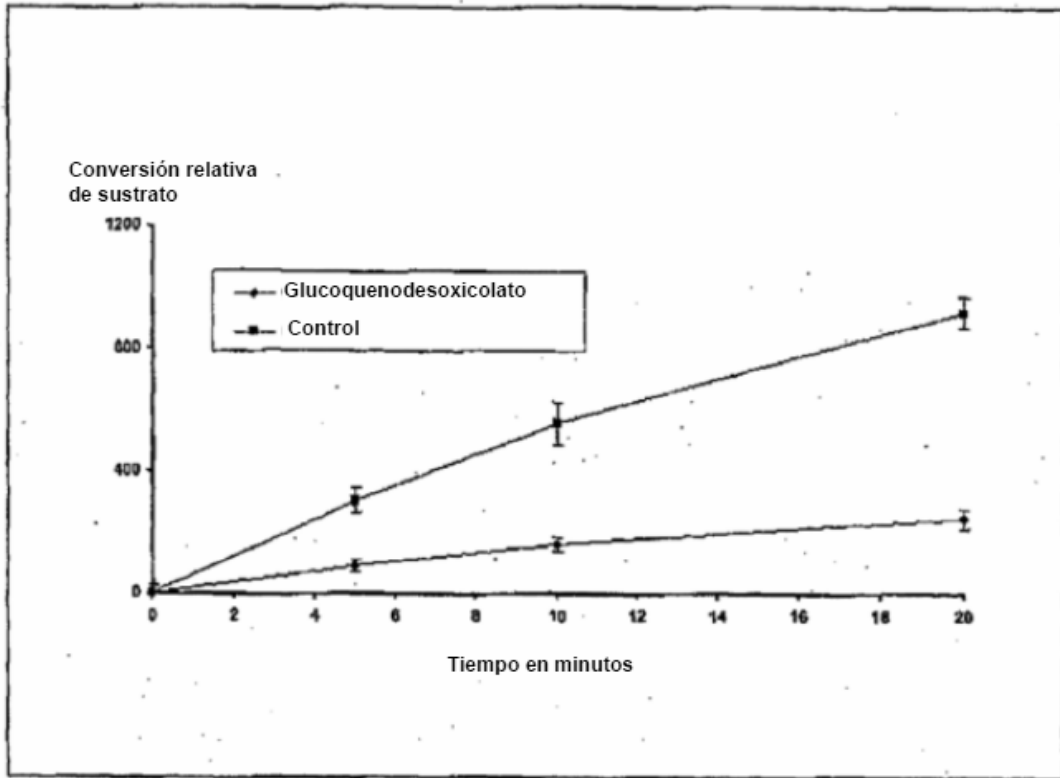


Figura 11

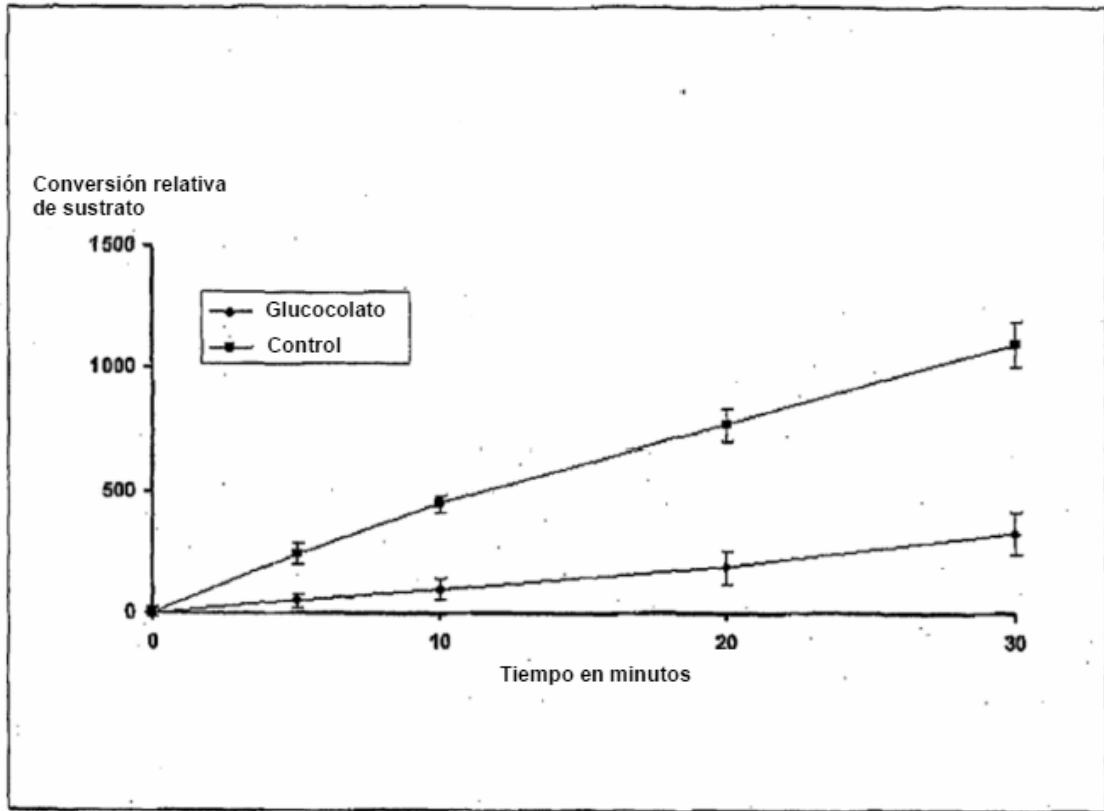


Figura 12

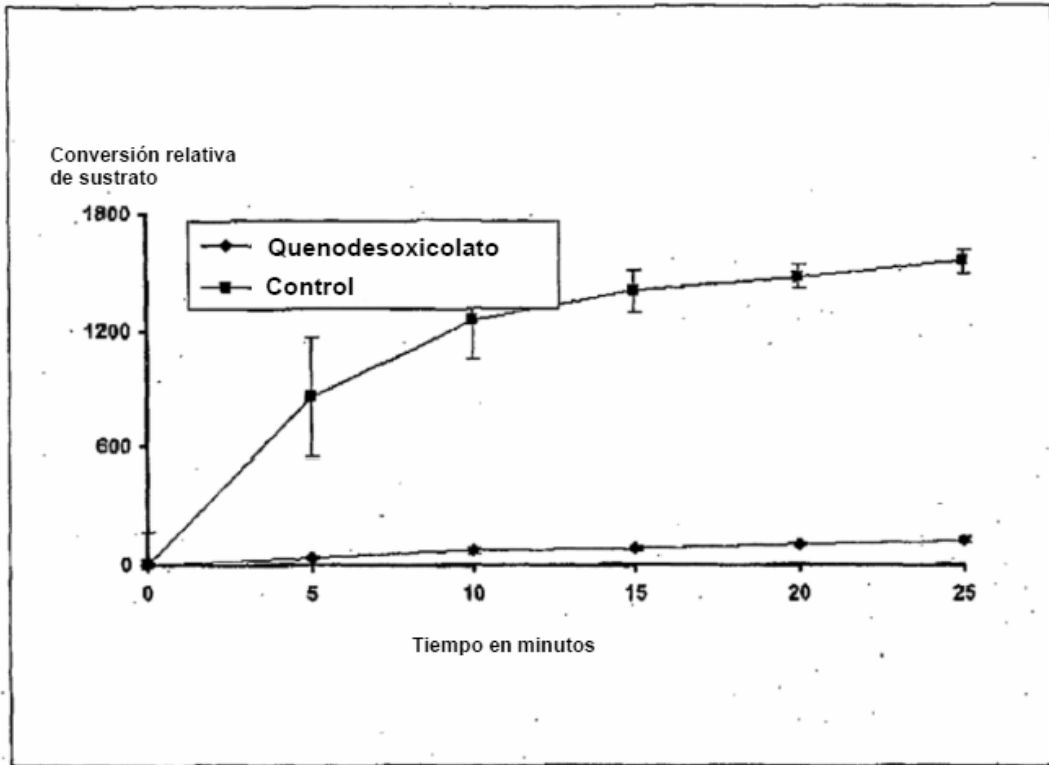


Figura 13

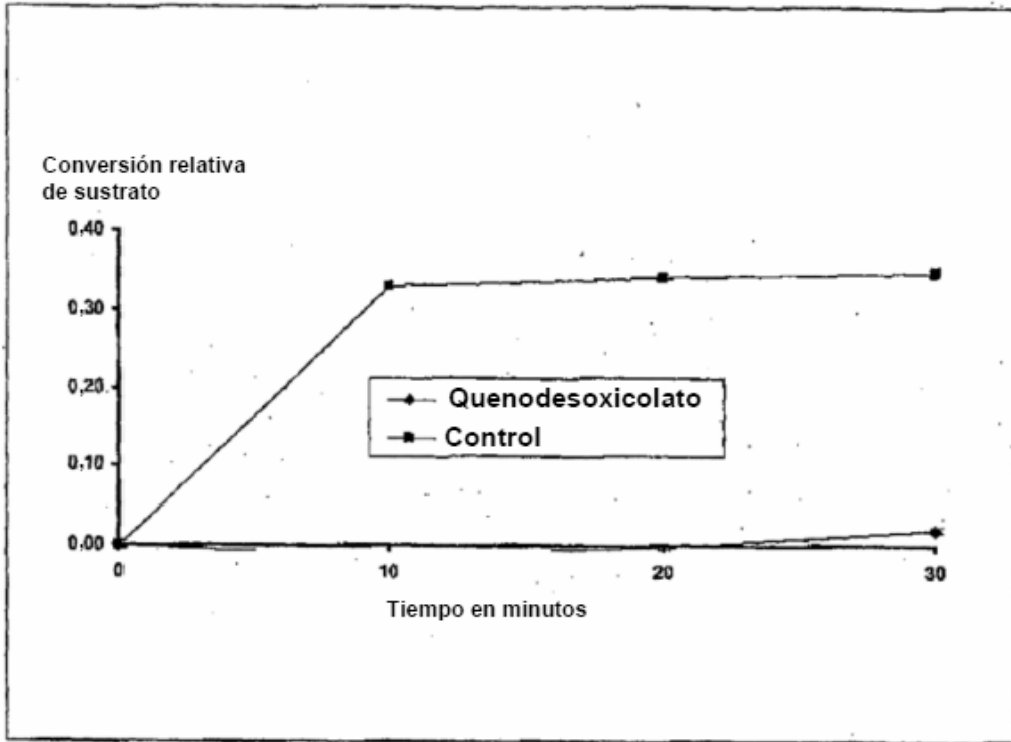


Figura 14

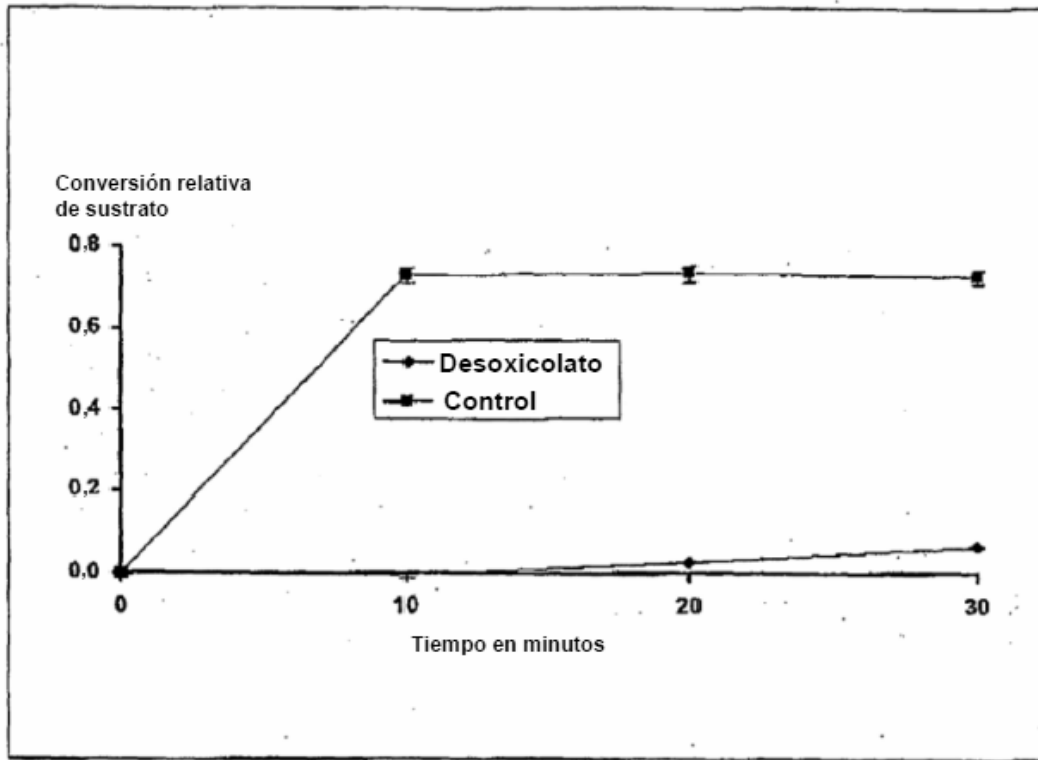


Figura 15

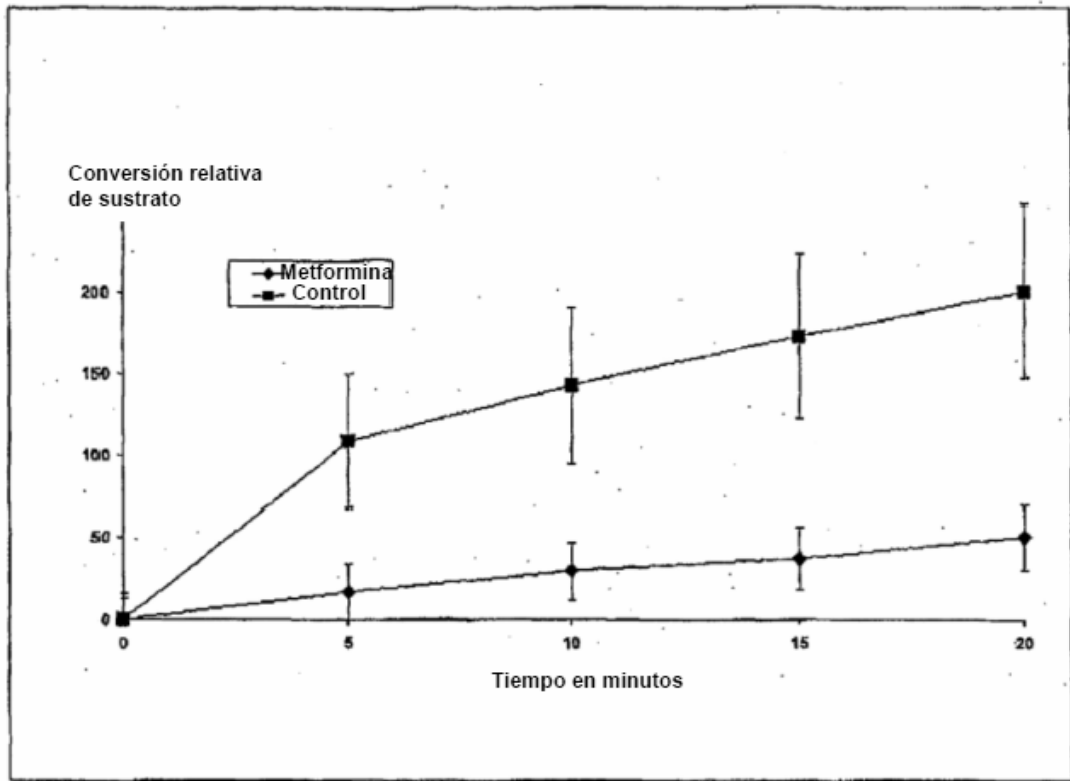




Figura 16

