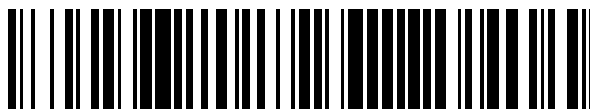


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 577**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009** **E 09749099 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2389198**

54 Título: **Péptidos GLP-1 insulíntrópicos monoconjugados específicos de sitio**

30 Prioridad:

20.11.2008 IT MI20082066

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

21.07.2015

73 Titular/es:

BIO-KER S.R.L. (100.0%)

Via Fantoli 16/5

20138 Milano, IT

72 Inventor/es:

TONON, GIANCARLO;

ORSINI, GAETANO;

SERGI, MAURO;

SCHREPFER, RODOLFO y

ESPOSITO, PIERANDREA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 541 577 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

Péptidos GLP-1 insulíntrópicos monoconjugados específicos de sitio

- 5 **[0001]** La presente invención está relacionada con el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y análogos de péptidos insulíntrópicos, monoconjugados con moléculas poliméricas biocompatibles por reacción directa enzimática y de transglutaminación específica de sitio, además de sus formulaciones farmacéuticas y sistemas de administración para aplicación terapéutica en patologías dismetabólicas tales como diabetes de tipo 2.

10 **Campo de la invención**

- [0002]** La diabetes mellitus es una enfermedad que se sabe que existe desde hace miles de años y que actualmente afecta a más de 200 millones de personas en el mundo. Además de la disminución de la esperanza de vida y menor calidad de vida de los individuos con diabetes, la enfermedad y sus complicaciones asociadas son una carga importante para los presupuestos sanitarios.

- [0003]** La forma más común de la diabetes es la diabetes de tipo 2 (o diabetes no mellitus dependiente de insulina) que tiene tanto componentes genéticos como ambientales y representa un grupo heterogéneo multifactorial de trastornos, que resultan de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina, o ambos, y conduce a niveles incontrolados o elevados de glucosa en sangre.

- [0004]** En países industrializados, aproximadamente el 90 % de los individuos con diabetes tienen diabetes de tipo 2 cuya prevalencia ha aumentando espectacularmente durante las últimas décadas, lo más probablemente bajo la influencia de las modificaciones del nivel de dieta y actividad física.

- [0005]** La diabetes de tipo 2 normalmente se produce en adultos con sobrepeso por encima de la edad de 45; sin embargo, la incidencia de la diabetes de tipo 2 en niños con sobrepeso (normalmente por encima de la edad de 10) también está aumentando rápidamente.

- [0006]** Las actuales terapias en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 incluyen intervención en el estilo de vida mediante la modificación de la dieta y el ejercicio físico, y tratamiento con agentes hipoglucémicos orales o inyectados; sin embargo, no todos los individuos con diabetes de tipo 2 responden de la misma forma a estos tratamientos.

- [0007]** Un mejor entendimiento de las respuestas fisiológicas a comidas permitió el descubrimiento de las hormonas incretinas y el desarrollo de nuevos agentes cuya acción terapéutica se basa en la potenciación de la acción de las hormonas gastrointestinales [Drucker DJ, 2001].

- [0008]** Estas terapias están asociados al ralentizamiento del vaciamiento gástrico, estimulación de insulina e inhibición de la secreción de glucagón, mejora del control de la hiperglucemia postprandial y control de peso corporal.

- [0009]** Las incretinas son hormonas derivadas del intestino liberadas por nutrientes que potencian la secreción de insulina bajo elevadas condiciones glucémicas. El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) humano es una hormona incretina prototípica, originada a partir del gen preproglucagón y secretada de células L enteroendocrinas del intestino después del consumo de alimentos, presentando un potente efecto reductor de la glucosa en sangre mediante diferentes mecanismos fisiológicos que incluyen la secreción de insulina endógena en un modo dependiente de glucosa, la disminución de los niveles de glucagón en sangre y la reducción del vaciamiento gástrico al ralentizarse la motilidad gástrica. Además, el GLP-1 estimula la proliferación y diferenciación de nuevas células β del páncreas, conduciendo al aumento de la masa de células β [Holst JJ, 2007].

- [0010]** La forma principal del GLP-1 humano circulante es un péptido amidado del extremo C de 30 residuos de aminoácidos generalmente indicado como GLP-1(7-36)-amida (SEC ID N° 1); una forma extendida por glicina no desamidada secundaria y del extremo C de 31 residuos de aminoácidos, generalmente indicada como GLP-1 (7-37), también es detectable en sangre (SEC ID N° 2). Ambos péptidos muestran las mismas actividades biológicas y son equipotentes. Para los fines de la presente invención, como se muestra por SEC ID N° NO 1 y 2, los péptidos GLP-1 y sus análogos se informan según la numeración de cadenas de péptidos a partir del residuo de histidina del extremo N.

SEC ID 1			
GLP-1 (7-36) amida:			
1	11	21	
HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLWKGR-CONH ₂			
SEC ID 2			
GLP-1 (7-37) extendido por glicina			
1	11	21	31
HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLWKGR G-COOH			

[0011] La acción insulínica de los péptidos GLP-1 y análogos, que es la estimulación de la secreción de insulina solo cuando los niveles de glucosa en plasma están por encima del valor fisiológico normal, hace de estos compuestos posibles candidatos para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Los péptidos GLP-1 ejercen sus efectos biológicos mediante siete receptores acoplados a la proteína G transmembranaria expresados en la célula β de los islotes de Langerhans, además de en el tubo gastrointestinal y otros tejidos que incluyen corazón, riñón, pulmones y cerebro. Estudios de la relación de estructura-actividad de péptidos GLP-1 llevados a cabo por mutagénesis por cribado con alanina demostraron que las posiciones 1, 4, 6, 7, 9, 13, 15, 22, 23 y 26 son críticas para la unión al receptor [Adelhorst K, et al., 1994; Gallwitz B et al., 1994].

[0012] Ejemplos de análogos de GLP-1 incluyen exendina-3 y exendina-4, dos péptidos de 39 aminoácidos originalmente aislados del veneno del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*), que comparten aproximadamente el 50 % de identidad de secuencias con el propio GLP-1 y son de hecho agonistas del receptor de GLP-1. Se ha autorizado una preparación sintética de exendina-4 (exenatida) en tanto EE.UU. como Europa como terapia complementaria para el tratamiento de diabetes de tipo 2 basándose en dos inyecciones subcutáneas diarias [Davidson MB et al., 2005].

[0013] Desafortunadamente, el uso terapéutico de péptidos GLP-1 está limitado por una semivida en plasma muy corta (por ejemplo, GLP-1-amida tiene una $t_{1/2}$ < 1,5 minutos después de la administración intravenosa) principalmente debido a la rápida degradación por la dipeptidil peptidasa IV del plasma (DPP-IV) o CD26, una proteasa tipo serina que escinde dipéptidos del extremo N de cadenas de polipéptidos después de un residuo de prolina o de alanina. La actividad biológica de los péptidos GLP-1 circulantes naturales está de hecho regulada por la escisión mediada por DPP-IV del extremo N en el residuo de alanina-2 para dar el metabolito inactivo des-His-Ala-péptido GLP-1.

[0014] Incluso la exenatida, que se diferencia del GLP-1 en la posición 2 del extremo N que confiere resistencia a DPP-IV y es, por tanto, esencialmente eliminada por filtración glomerular, cuando se inyecta intravenosamente muestra una semivida en plasma de aproximadamente 30 minutos. La rápida inactivación y/o eliminación de los péptidos GLP-1 y análogos ha estimulado el interés en los agonistas de receptores de GLP-1 resistentes a la degradación de acción prolongada que presentan duración prolongada de la acción con respecto a los péptidos GLP-1 naturales después de la administración *in vivo*. Ejemplos de estos derivados de GLP-1 se informan ampliamente en tanto la bibliografía científica como de patentes; pueden obtenerse, entre otros, según los siguientes enfoques:

a) por sustituciones de aminoácidos selectivas en la cadena peptídica de GLP-1 que confieren resistencia a DPP-IV como, por ejemplo, por sustitución del segundo aminoácido L-alanina del extremo N con D-alanina o serina produciendo análogos de GLP-1 que mantienen la actividad insulínica con un aumento significativo de la estabilidad en plasma y semivida *in vivo* [Uçkaya G et al., 2005; Ritzel U et al., 1998; Buckley DI et al., US5545618]

b) uniendo uno o más sustituyentes lipófilos a las cadenas laterales de residuos de aminoácidos de GLP-1 y análogos de GLP-1 en los que los sustituyentes lipófilos comprenden de 4 a 40 átomos de carbono y están químicamente conjugados con aminoácidos tanto directamente como mediante un espaciador. Algunos de estos análogos de GLP-1 derivatizados con restos lipófilos mostraron un perfil de acción extendido *in vivo* y mayor persistencia en plasma en comparación con GLP-1 natural (Knudsen L et al., EP0944 648)

c) explotando los péptidos insulínicos que se producen naturalmente tales como, por ejemplo, exendina-3 y exendina-4 (o su forma sintética correspondiente exenatida), dos péptidos de 39 aminoácidos originalmente aislados de las glándulas salivales de lagartos [Eng J et al., 1992] que se encontró que eran potentes agonistas de receptores de GLP-1. La exenatida, cuya eficacia terapéutica también se demostró en pacientes con diabetes de tipo 2, comparte aproximadamente el 50 % de identidad de secuencias con GLP-1, mientras que se diferencia en la posición 2 del extremo N en la que la alanina está sustituida con un residuo de glicina, que confiere resistencia a DPP-IV y una semivida comparativamente mayor sin reducir la actividad biológica.

Sin embargo, la administración terapéutica de péptidos humanos que llevan sustituciones y/o adiciones de aminoácidos, además de péptidos de origen no humano, tal como la exenatida, puede fomentar una respuesta

inmunitaria no deseada que puede disminuir la eficacia del fármaco o inducir acontecimientos adversos en pacientes, como se ha informado, por ejemplo, en estudios clínicos que muestran que el tratamiento con exenatida durante 30 semanas indujo la formación de anticuerpos anti-exenatida en más del 40 % de los pacientes [Schnabel CA et. 2006].

d) por conjugación química de péptidos GLP-1 con poli(etilenglicol) (PEG) para dar derivados con vida biológica prolongada debido a la elevada resistencia proteolítica y, en algunos casos, reducida filtración glomerular. Podrían prepararse péptidos GLP-1 monopegilados específicos de sitio por pegilación química selectiva con monometoxi-PEG (m-PEG) funcionalizado con propionaldehído llevado a cabo a pH 4,5 sobre el grupo α -amino del residuo de His¹ del extremo N; sin embargo, se mostró que el GLP-1 mono-pegilado resultante, aunque es resistente a la degradación por DPP-IV, tenía poca actividad biológica *in vitro* [Lee SH et al. 2005].

[0015] El documento WO2005070468 describe un método para conjugar péptidos en presencia de transglutaminasa, que comprende hacer reaccionar en una o más etapas un péptido con un primer compuesto en presencia de transglutaminasa y posteriormente hacer reaccionar dicho péptido funcionalizado con un segundo compuesto. La pegilación de proteínas específica de sitio por el uso de transglutaminasa también se describe por Sato H. [Adv Drug Deliv Rev. 2002 Jun 17;54(4):487-504], en el que una secuencia de sustrato corta para G-TGasa se introduce en el extremo de la proteína.

[0016] Se mostró un equilibrio favorable entre la resistencia a la degradación por peptidasa y la actividad insulínica para GLP-1-amida monopegilada sobre el residuo de Lys²⁰, además de para GLP-1-amida monopegilada sobre Lys²⁸ que se preparó por una síntesis química de múltiples etapas que incluye protección con anhídrido maleico de grupos ϵ -amino de la lisina, separación cromatográfica de isómeros de GLP-1 protegidos en Lys²⁰ y Lys²⁸, pegilación química llevada a cabo independientemente sobre cada isómero haciendo reaccionar grupos ϵ -amino de la lisina libres con m-PEG de 2 kDa funcionalizado con propionato de succinimidilo, seguido de eliminación del grupo maleico protector [Youn YS et al., 2007].

[0017] Aunque estos análogos de GLP-1 resistentes a la degradación prolongan la semivida de péptidos GLP-1 de algunos minutos a algunas horas, su aplicación terapéutica para el tratamiento de diabetes todavía requiere inyecciones de una vez o dos veces al día, de manera que todavía existe una necesidad de desarrollar agentes de acción prolongada que presenten una semivida circulante más prolongada y que requieran una frecuencia reducida de administraciones parenterales. Ejemplos de estos enfoques se conocen en la técnica e incluyen, entre otros:

a) derivados acilados de GLP-1 humano o sus análogos, como por ejemplo liraglutida o {Arg²⁸-Lys²⁰-N-[ϵ -(γ -Glu{N- α -hexadecanoil})]-GLP-1} en la que el resto de acilo promueve la unión de albúmina de suero *in vivo* y prolonga la semivida a aproximadamente 13-15 horas sin reducción de potencia [Knudsen LB et al., 2000].

b) péptidos GLP-1 resistentes a DPP-IV unidos covalentemente mediante tecnología de ADN recombinante a una gran proteína plasmática como, por ejemplo, albúmina humana, para dar una proteína fusionada de GLP-1-albúmina o Albugon que muestra una semivida de 3 días en monos [Bloom M. et al., 2003]

c) por atrapamiento de péptidos GLP-1 en polímeros biodegradables que actúan de depósito para administrar GLP-1 a tasas de liberación sostenida y controlada [Choi A et al., 2004]

[0018] En la presente invención, los presentes inventores tratan el problema de péptidos insulínicos de larga duración mediante la preparación de péptidos GLP-1 y análogos de péptidos GLP-1 monoconjugados con polímeros biocompatibles por reacción de transglutaminación específica de sitio directa enzimática, además de sus formulaciones farmacéuticas y sistemas de administración útiles para aplicación terapéutica en diabetes de tipo 2.

Descripción de la invención

[0019] La presente invención se refiere a derivados monoconjugados de un péptido 1 similar al glucagón según la reivindicación 1 caracterizados, con respecto a los péptidos naturales, por el mantenimiento de actividad biológica útil terapéutica, resistencia a la degradación de peptidasa y semivida circulante prolongada. Estos nuevos compuestos se obtienen por monoconjugación específica de sitio con polímeros biocompatibles mediante una reacción catalizada por transglutaminasa (Tgasa) directa tanto sobre un residuo de glutamina naturalmente presente sobre péptidos miméticos de incretina, tales como péptidos GLP-1, como sobre un residuo de glutamina introducido en las cadenas peptídicas de GLP-1 en sustitución de otros residuos naturalmente presentes o sobre un residuo de glutamina añadido a las cadenas peptídicas de GLP-1.

[0020] La presente invención se refiere además a una formulación según la reivindicación 7 que contiene los derivados monoconjugados de la presente invención.

[0021] La presente invención todavía se refiere además a un proceso para la preparación de los derivados monoconjugados de la presente invención, según la reivindicación 10.

[0022] Para los fines de la presente invención, el término péptidos miméticos de incretina significa un compuesto que imita la acción de la hormona incretina que se produce naturalmente GLP-1 potenciando la secreción de insulina

dependiente de glucosa y acciones reductoras de glucosa relacionadas tales como, por ejemplo, inhibición de la liberación de glucagón tras las comidas, ralentizamiento de la tasa de vaciamiento gástrico y promoción de la saciedad.

5 **[0023]** Es muy sabido que la conjugación de moléculas de péptidos o de proteínas con polímeros hidrófilos biocompatibles de alto peso molecular modifica las propiedades fisicoquímicas de los complejos conjugados resultantes, manteniendo en gran medida la función biológica de la molécula no conjugada original, tal como por ejemplo la capacidad de reconocimiento de receptores. Al mismo tiempo, la conjugación de proteínas y péptidos con un resto polimérico puede dificultar el contacto físico entre la proteína y tanto enzimas proteolíticas específicas como
10 no específicas que previenen o que reducen la proteólisis enzimática. Restos poliméricos muy conocidos que se han usado en la conjugación de proteínas terapéuticas son cadenas de poli(etilenglicol) (PEG) lineal o ramificado con peso molecular entre aproximadamente 2 kDa y 60 kDa. La conjugación covalente de tales polímeros con uno o más residuos en la molécula de proteína modifica varios aspectos funcionales de los complejos conjugados que incluyen, por ejemplo, la eliminación renal gracias al aumento del tamaño molecular aparente, la estabilidad hacia la degradación enzimática, además de la reducción de la inmunogenicidad debido al enmascaramiento de epítopes
15 inmunogénicos sobre la superficie de la proteína. Hay un gran interés en desarrollar proteínas terapéuticas conjugadas con poli(etilenglicol) (PEGiladas) debido a su estabilidad mejorada y su perfil farmacocinético más favorable que permite frecuencia de menor dosis que sus homólogos no PEGilados [Greenwald RB et al., 2003].

20 **[0024]** Ejemplos de proteínas terapéuticas comercialmente disponibles como derivados PEGilados son, entre otras, PEG-interferón-alfa, usada para el tratamiento de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C, PEG-Filgrastim (PEG-factor estimulante de colonias de granulocitos), que estimula la producción de granulocitos y diferenciación en médula ósea, y Pegvisomant, un antagonista del receptor de la hormona de crecimiento humana pegilado que está indicado para el tratamiento de acromegalia [Parveen S y Sahoo SK, 2006].

25 **[0025]** Métodos para la conjugación química de proteínas y péptidos con PEG se conocen en la técnica como se ejemplifica por las siguientes referencias básicas: Davis FF et al., US4179337; Veronese et al., documento WO2005099769; Nucci ML et al., 1991; Delgado C et al., 1992; Zalipski S, 1995; Roberts MJ et al., 2002.

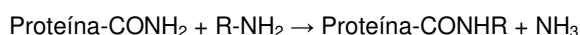
30 **[0026]** Las proteínas terapéuticas pegiladas, como cualquier otro fármaco, deben ser idealmente productos homogéneos con características estructurales y funcionales bien definidas. Sin embargo, la pegilación química de proteínas se basa en reacciones no específicas con residuos nucleófilos (lo más comúnmente el grupo ε-amino de residuos de lisina superficial o los grupos carboxílicos de la cadena lateral) y produce diferente grado de conjugación y/o mezclas de isómeros de posición pegilados cada uno de los cuales podría dar lugar a variaciones en
35 características relevantes para la aplicación clínica que incluye actividad biológica y aparición de efectos secundarios.

[0027] En algunos casos, es posible preparar proteínas monopegiladas esencialmente específicas de sitio explotando la reactividad preferencial, a pH ácido, del grupo alfa-amino del residuo del extremo N con cadenas de monometoxi-PEG (m-PEG) funcionalizado con aldehído seguido de alquilación reductora [Kinstler OB et al., documento US5985265], como se aplica para producir el PEG-filgrastim monoconjugado del extremo N comercializado como una forma de larga duración de G-CSF [Kinstler OB et al., 1996].
40

[0028] Desafortunadamente, la aplicación de la pegilación química selectiva del extremo N anteriormente mencionada a péptidos GLP-1 da derivados monopegilados específicos de sitio que carecen de actividad biológica debido al hecho de que el residuo de histidina del extremo N participa en la unión y activación del receptor; por otra parte, la pegilación química selectiva de uno de los dos residuos de lisina de péptidos GLP-1 para dar derivados monopegilados biológicamente activos tanto sobre el residuo Lys²⁰ como sobre Lys²⁸ solo fue posible mediante un método de bajo rendimiento, complejo y de múltiples etapas que implica la protección química de grupos ε-amino de la lisina, separación cromatográfica de isómeros GLP-1 protegidos en Lys²⁰ y Lys²⁸, pegilación química independiente convencional de cada isómero, seguido de eliminación de grupo protector del residuo de lisina sin reaccionar [Youn YS et al. 2007].
50

[0029] Una forma posible para vencer las limitaciones de los enfoques químicos anteriormente mencionados y para preparar péptidos GLP-1 monoconjugados específicos de sitio y derivados y análogos de GLP-1 con polímeros biocompatibles es explotar la aplicación de la conjugación selectiva catalizada por transglutaminasa entre polímeros biocompatibles funcionalizados con un grupo amino primario y un único residuo de glutamina contenido en los péptidos similares a GLP-1.
55

[0030] Las transglutaminasas (E.C. 2.3.2.13; proteína-glutamina γ-glutamyltransferasa; Tgasa) son enzimas de origen tanto eucariota como procariota que catalizan una reacción de transferencia de acilo entre un grupo γ-carboxiamido del residuo de glutamina unido a la proteína y un grupo ε-amino de un residuo de lisina o una variedad de aminas primarias, en particular alquilaminas de cadena lineal, según el siguiente esquema de reacción:
60



en la que $-\text{CONH}_2$ es el grupo γ -carboxamida de un residuo de glutamina unido a la proteína que actúa de donante de acilo y R-NH_2 representa una variedad de aminas primarias (incluyendo un grupo ϵ -amino de residuos de lisina en la cadena de proteína) que actúa de aceptor de acilo.

[0031] Las transglutaminasas eucariotas actualmente conocidas incluyen, entre otros, el factor de coagulación de la sangre XIIIa, la Tgasa de queratinocitos (Tgasa tipo 1) y la Tgasa de tipo tejido ubicua (Tgasa tipo 2). Las diversas Tgasas eucariotas pertenecen a una familia de isoenzimas compuestas de varias subunidades y que comparten un alto grado de tanto similitud de secuencias como propiedades funcionales, con masas moleculares de aproximadamente 75-90 kDa y un mecanismo de acción catalítico dependiente de Ca^{2+} similar [Esposito C y Caputo I, 2004].

[0032] Más recientemente, se encontraron transglutaminasas procariotas en cepas de *Streptomyces* y *Bacillus*, además de en diversos otros microorganismos [Ando H et al., 1989; Kobayashi K et al., 1996], y también se clonaron y expresaron como proteínas recombinantes [Kobayashi K et al., 1998; Yokoyama K et al., 2000; Fuchsbauer H et al., documento EP1068301]. Con respecto a Tgasas eucariotas, las Tgasas microbianas (M-Tgasas) son enzimas monoméricas con una masa molecular de aproximadamente 38-40 kDa y una actividad catalítica independiente del Ca^{2+} .

[0033] Tanto las Tgasas de mamífero como microbianas actúan con una selectividad específica sobre la cadena lateral de los residuos de glutamina de proteínas que representan el resto donante de acilo mientras que se mostró selectividad mucho menor o no se mostró hacia el grupo amino primario que representa el resto aceptor de acilo. En realidad, ambas Tgasas reaccionan no solo con los grupos ϵ -amino de residuos de lisina sobre cadenas de proteínas, sino también con compuestos que llevan un grupo amino primario o con alquilaminas alifáticas, preferentemente con aminas alifáticas primarias sobre una cadena lineal de al menos cuatro átomos de carbono [Ohtsuka T et al., 2000].

[0034] Además, aunque sigue siendo desconocida la base para la especificidad de la glutamina en la reacción catalizada por Tgasas, hay indicaciones de que el microentorno que rodea la glutamina diana puede influir en su capacidad para actuar de sustrato de Tgasas; por ejemplo, se ha informado que cadenas laterales positivamente cargadas o estéricamente molestas que preceden o siguen a un residuo de glutamina pueden influir positivamente en el reconocimiento sobre la parte de enzima [Cousson PJ et al., 1992; Ohtsuka T et al., 2000]; por otra parte, la secuencia de proteínas que tiene el resto de glutamina flanqueado por tanto dos residuos positivamente cargados como dos residuos de prolina impiden la correcta interacción con Tgasas [Pastor MT et al., 1999].

[0035] Aunque no se ha identificado sitio consenso específico alrededor de los residuos de glutamina modificados por la reacción catalizada por Tgasas, comúnmente se cree que tanto las Tgasas de mamífero como microbianas pueden reconocer como sustrato residuos de glutamina localizados sobre una región accesible al disolvente, flexible y localmente sin plegar de la cadena de proteína que engloba aquellos residuos de glutamina [Fontana A et al., 2008]. Basándose en estas características, las reacciones catalizadas por Tgasas tanto procariotas como eucariotas se han aplicado a la incorporación selectiva de sitio de moléculas funcionalizadas con amino en proteínas, que incluyen cadenas de m-PEG funcionalizadas con alquil-amino como se informa en la bibliografía de patente [véanse, por ejemplos, Takahara Y, documento EP785276; Takahara Y et al., documento US6010871] y en documentos científicos [Sato H et al., 2000; Sato H, 2002] que describen el uso de transglutaminasas para unir covalentemente cadenas de polímero a péptidos y proteínas con al menos un residuo de glutamina en su secuencia de aminoácidos, en la que las glutaminas pueden estar tanto naturalmente presentes en la cadena de proteína como insertadas por mutagénesis específica de sitio.

[0036] Además, según los ejemplos anteriormente desvelados, estas reacciones de conjugación catalizadas por Tgasa se llevaron a cabo en presencia de un exceso significativo de sustratos de m-PEG funcionalizados con grupos amino primarios (que estaban presentes en aproximadamente 100-1000 veces de exceso molar) con respecto a los sustratos de proteína que contienen glutamina. Estas condiciones representan inconvenientes económicos y técnicos obvios cuando el proceso de conjugación enzimática tiene que realizarse a escala industrial, en particular con polímeros funcionalizados con amino de alto peso molecular como, por ejemplo, con alquilamino-m-PEG de 20-60 kDa que son tanto caros como difíciles de manipular a concentraciones tan altas.

[0037] En lo que respecta a la pegilación catalizada por Tgasa de péptidos GLP-1, una reciente solicitud de patente [Johansen L et al., documento WO070468] enseña un método de dos etapas para vencer estas limitaciones: en la primera etapa un resto químico funcionalizado pequeño se transfiere sobre el residuo de glutamina individual de péptidos GLP-1 por la acción de Tgasas tanto de mamífero como microbianas y la glutamina funcionalizada intermedia resultante se conjuga a su vez químicamente con una cadena de m-PEG que lleva un grupo reactivo capaz de reaccionar con el grupo funcional previamente introducido por la catálisis de Tgasas. Como la primera etapa implica un compuesto de bajo peso molecular, su uso en gran exceso en la reacción enzimática de transglutaminasa puede manipularse fácilmente.

[0038] Los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente, y representa el objetivo principal de la presente invención, que los péptidos GLP-1 y análogos insulínótropicos de GLP-1 y derivados que llevan un residuo

de glutamina individual pueden conjugarse directamente con polímeros funcionalizados con alquilamino con alto rendimiento; el término “directamente” se usa en el presente documento para indicar que el enlace covalente se produce “directamente” entre el péptido GLP-1 y el polímero funcionalizado con alquilamino, es decir, sin la necesidad de ningún conector intermedio. Preferentemente, estas alquilaminas pueden ser m-PEG lineal o ramificado de peso molecular de 2 a 50 kDa, preferentemente de 5 a 40 kDa, más preferentemente de 10 a 30 kDa, incluso más preferentemente de 15 a 25 kDa; en la realización preferida, el m-PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

[0039] Tales polímeros están conjugados por una reacción enzimática directa catalizada por una transglutaminasa, preferentemente una transglutaminasa microbiana (M-Tgasa), con una relación molar entre polímeros funcionalizados con alquilamino y péptidos similares a GLP-1 comprendida entre 1:1 y 1:100, preferentemente entre 1:5 y 1:35, más preferentemente entre 1:15 y 1:25; según una realización más preferida, es aproximadamente 1:20. También sorprendentemente, y contrario a la enseñanza del documento WO070468, los presentes inventores han encontrado que solo la M-Tgasa puede catalizar una reacción de conjugación directa entre m-PEG-aminas y péptidos GLP-1 o análogos insulínotropicos de GLP-1, mientras que la conjugación no enzimática de derivados de GLP-1 podría obtenerse cuando una transglutaminasa de mamífero, tal como Tgasa de hígado de cobaya, se usó para catalizar la transferencia de polímeros funcionalizados con amino sobre el residuo de glutamina individual de péptidos similares a GLP-1 o sustratos de exenatida

[0040] Los resultados de algunos estudios experimentales de mono-pegilación enzimática directa de GLP-1-amida y exenatida se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Ejemplos de monopegilación específica de sitio directa catalizada por transglutaminasas de GLP-1-amida. Todas las reacciones se realizaron durante 16 horas.						
GLP-1 mg/ml	GLP-1/ mPEG-NH2 relación molar	mPEG-NH2 MW	Tgasa	Tampón	Temp °C	GLP-1 monopegilado % de rendimiento
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U /ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	60 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U /ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	25	55 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml x 2(*)	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	25	58 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4	25	56 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	25	33 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	37	31 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	4	44 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	4	30 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	37	55 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 5 % de DMSO	25	55 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	Citrato de Na 10 mM pH 8,0	25	60 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	Tris HCl 100 mM pH 7,5	25	51 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	Tris HCl 50 mM pH 7,5	25	58 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	60 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	25	57 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	4	54 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	25	44 %
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4 + 10 % de DMSO	4	28 %

Ejemplos de monopegilación específica de sitio directa catalizada por transglutaminasas de GLP-1-amida. Todas las reacciones se realizaron durante 16 horas.						
GLP-1 mg/ml	GLP-1/ mPEG-NH2 relación molar	mPEG-NH2 MW	Tgasa	Tampón	Temp °C	GLP-1 monopegilado % de rendimiento
0,3	1/20	30 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	36 %
0,3	1/20	42 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	21 % (53 % en 24 h)
0,3	1/20	30 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4	25	43 %
0,3	1/20	42 kDa	M-Tgasa 0,5 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	37	31 %
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,25 U/ml	Tris 50 mM pH 8 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,5 U/ml	Tris 50 mM pH 8 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,3 U/ml	Tris 50 mM pH 7,5 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,3 U/ml	Tris 100 mM pH 7,5 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,5	1/500	5 kDa	Tgasa de cobaya 0,3 U/ml	Tris 50 mM pH 7,5 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,25	1/500	5 kDa	Tgasa de cobaya 0,3 U/ml	Tris 50 mM pH 7,5 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,25	1/500	5 kDa	Tgasa de cobaya 0,3 U/ml	Tris 50 mM pH 7,5 - CaCl ₂ 10 mM	37	Sin PEGilación

(*) Se añadió una segunda alícuota de 0,25 U/ml de M-Tgasa después de 6 horas

Tabla 2

Ejemplos de monopegilación específica de sitio directa catalizada por transglutaminasas de exenatida. Todas las reacciones se realizaron durante 16 horas.						
Exenatida mg/ml	Exenatida/ mPEG-NH2 relación molar	mPEG-NH2 MW	Tgasa	Tampón	Temp °C	Exenatida monopegilada % de rendimiento
0,5	1/20	20 kDa	M-Tgasa 0,25 U/ml	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	58 %
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,25 U/ml	Tris 50 mM pH 8 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación
0,5	1/20	20 kDa	Tgasa de cobaya 0,5 U/ml	Tris 50 mM pH 8 - CaCl ₂ 10 mM	25	Sin PEGilación

[0041] Por tanto, el objetivo principal de la presente invención era proporcionar un método para la reacción directa catalizada por M-Tgasa entre un residuo de glutamina individual contenido en péptidos GLP-1 y en análogos insulíntrópicos de GLP-1 y un polímero biocompatible funcionalizado con amino, tal como, por ejemplo, m-PEG con alquilamino lineal o ramificado de peso molecular de 2 a 60 kDa, para dar derivados monoconjugados que actúan de miméticos de incretina porque pueden mostrar actividades biológicas *in vivo* similares a las actividades biológicas de hormonas incretinas naturales.

[0042] Otra realización de la presente invención se representa por péptidos GLP-1 monoconjugados por reacción directa catalizada por M-Tgasa con polímeros biocompatibles sobre el residuo de glutamina individual naturalmente presente en la posición 17 de GLP-1-amida o GLP-1 extendido por glicina en el extremo C o sobre el residuo de glutamina individual naturalmente presente en la posición 13 de la exenatida.

[0043] Combinando el hecho de que los péptidos GLP-1 y análogos de péptidos insulíntrópicos no tienen estructura definida en disolución acuosa [Thornton K y Gorenstein DG, 1994] con la capacidad informada de las

Tgasas para reconocer como sustrato residuos de glutamina localizados sobre región accesible al disolvente, flexible y localmente sin plegar de la cadena de proteína [Fontana A et al., 2008], podría esperarse que los residuos de glutamina introducidos en la cadena peptídica de péptidos Q17N-GLP-1 y análogos de Q17N-GLP-1 proporcionarían sustratos alternativos para la reacción de monoconjugación directa catalizada por M-Tgasa con polímeros biocompatibles. Inesperadamente, sin embargo, cuando varias de estas variantes de Q17N-GLP-1 que contienen glutamina incluyen, por ejemplo, derivados con una sustitución de glutamina individual en las posiciones 2, 5, 8, 11, 12 y 24 reaccionaron con m-PEG funcionalizado con amino en presencia de M-Tgasa, se encontró sorprendentemente que todos los mutantes, excepto A24Q/Q17N-GLP-1, no fueron sustratos de M-Tgasa y, por consiguiente, con la excepción de A24Q/Q17N-GLP-1 monopegilado sobre el residuo de glutamina individual en la posición 24, no dieron los derivados monopegilados esperados que se informaron, por ejemplo, en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplos de monopegilación específica de sitio directa catalizada por M-Tgasa de algunos mutantes de Q17N-GLP-1-amida. Todas las reacciones se realizaron durante 16 horas.							
Q17N-GLP-1		Q17-GLP-1 / mPEG-NH2	mPEG-NH2	M-Tgasa	Tampón	Temp	Resultado
Mutante	mg/ml	Relación	MW	U/ml		°C	Rendimiento
A2Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	Sin PEGilación
A2Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	Sin PEGilación
T5Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	Sin PEGilación
S11Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	Sin PEGilación
S12Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	Sin PEGilación
A24Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	MonoPEGilación en Q24 rendimiento 45 %
A24Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	MonoPEGilación en Q24 rendimiento 40 %
A24Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 7,4 NaCl 0,15 M/EDTA 20 mM	25	MonoPEGilación en Q24 rendimiento 56 %
A24Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7,4	25	MonoPEGilación en Q24 rendimiento 50 %
A24Q	0,5	1/20	20 kDa	0,25	Citrato de Na 10 mM pH 8,0	25	MonoPEGilación en Q24 rendimiento 60 %

[0044] Otra realización de la presente invención se representa por Q17N-GLP-1-amida monoconjugada y análogos de péptidos Q17N-GLP-1 insulíntrópicos obtenidos por reacción directa catalizada por M-Tgasa con polímeros biocompatibles sobre un residuo de glutamina individual introducido en sustitución de cualquier residuo que tanto:

a) no participa en la unión del receptor de los péptidos GLP-1, es decir, cualquier residuo excepto aquellos en la posición 1, 4, 6, 7, 9, 13, 15, 22, 23 y 26 que son críticos para la unión del receptor [Adelhorst K et al., 1994; Gallwitz B et al., 1994]

b) como que lleva sustitución de glutamina en una posición que permite que actúe de donante de acilo en la reacción directa de transglutaminasa catalizada por M-Tgasa.

[0045] Los péptidos GLP-1 y análogos de péptidos GLP-1 y derivados, que se usan según la presente invención como sustratos para la reacción de mono-pegilación directa específica de sitio catalizada por M-Tgasa, pueden

prepararse por métodos químicos convencionales muy conocidos en la técnica, tales como por síntesis de péptidos en fase sólida o por reacción de condensación de fragmentos de péptidos como se ha desvelado previamente (véase, por ejemplo, Merrifield B, 1986 y Kaiser ET).

[0046] Alternativamente, los péptidos GLP-1 y análogos y derivados de péptidos GLP-1, que incluyen análogos de Q17N-GLP-1 que llevan sustitución de glutamina en cualquier residuo que no participa en la unión del receptor y en la posición que les permite actuar de sustrato donante de acilo de M-Tgasa, usados según la presente invención, también pueden prepararse por tecnologías de ADN recombinante según métodos muy conocidos en la técnica y previamente desvelados (véase, por ejemplo, Sambrock J et al., 1989).

[0047] Las reacciones enzimáticas directas de la presente invención se llevan a cabo disolviendo péptidos GLP-1 o análogos y derivados de péptidos GLP-1 en un tampón acuoso adecuado a pH entre 4 y 9, más preferentemente a pH entre 5 y 8 en una concentración entre 50 - 1000 μ M, más preferentemente entre 100 y 500 μ M, y añadiendo menos de 50, y preferentemente menos de 25 veces de exceso molar de m-PEG con alquilamino lineal o ramificado con masa molecular entre 2 y 60 kDa y 0,1 a 2 U/ml, más preferentemente 0,2 a 1 U/ml, de M-Tgasa y dejando la mezcla de reacción a temperatura entre 10 y 50 $^{\circ}$ C, más preferentemente entre 15 y 30 $^{\circ}$ C, durante 10 horas o más. La M-Tgasa puede ser, por ejemplo, una preparación de Activa WM comercialmente disponible de Ajinomoto o una preparación de cualquier M-Tgasa natural o derivada microbiana recombinante con actividad equivalente. Es muy conocido que la cinética de la reacción catalizada por M-Tgasa, como de cualquier reacción enzimática, pueda modularse por la temperatura y por la cantidad de enzima y, por consiguiente, el tiempo de reacción de las reacciones anteriormente descritas puede reducirse eligiendo cualquier combinación conveniente de concentración de enzima y temperatura compatible con el mantenimiento de la actividad catalítica. Los análogos de GLP-1 monopegilados específicos de sitio de la presente invención se purificaron por métodos tradicionales como precipitación por sales, diálisis, ultrafiltración, precipitación isoelectrónica, cromatografía en columna o por su combinación y se caracterizaron según métodos conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en la sección experimental. Como se ha informado antes, no se obtuvo pegilación cuando las reacciones catalizadas con Tgasa entre análogos de GLP-1 y m-PEG funcionalizado con amino se realizaron en presencia de una preparación de una Tgasa de mamífero, como se muestra en las Tablas 1 y 2.

[0048] Los péptidos GLP-1 monopegilados específicos de sitio y análogos mostraron resistencia mejorada hacia la degradación enzimática por DPP-IV estudiada a 37 $^{\circ}$ C *in vitro*, en comparación con el péptido sin modificar. En particular, como se muestra en la Tabla 4, mientras que la GLP-1-amida se inactivó completamente por la escisión del dipéptido del extremo N después de 8 horas a 37 $^{\circ}$ C, su derivado monopegilado todavía mantuvo aproximadamente el 70 por ciento de estructura activa, incluso después de 24 horas de incubación, con GLP-1-amida conjugada con cadenas de pEG de mayor peso molecular que son más resistentes a la escisión por DPP-IV, como se muestra en la Tabla 4 y Figura 1.

[0049] El derivado monopegilado del mutante de Q17N/A24Q-GLP-1 también mostró una resistencia similar a la degradación por DPP-IV *in vitro* como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 1.

Tabla 4

Degradación por DPP-IV de derivados de GLP-1-amida monopegilada en comparación con GLP-1-amida.	
Producto	Degradación % a 24 h
GLP-1-amida	100 (a 8 h)
GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa	37
GLP-1-amida-Q17-PEG 30 kDa	25
GLP-1-amida-Q17N/A24Q	90
GLP-1-amida-Q17N/A24Q-PEG 20 kDa	41

[0050] La actividad biológica *in vivo* de derivados de péptidos GLP-1 monopegilados, como se ha ensayado en una prueba de tolerancia a la glucosa oral llevada a cabo en ratones diabéticos, se evaluó en términos de capacidad estabilizante de glucosa global teniendo en cuenta los siguientes parámetros experimentales: nivel máximo de glucosa en sangre (Glu_{max} en mg/dl); tiempo hasta reducir el nivel de glucosa en sangre por debajo de 100 ($\pm$ 5) mg/dl ($T_{glu} < 100$ mg/dl) y grado hipoglucémico total como porcentaje de control de solución salina ($HD \% \text{ control} = \frac{ABC_{\text{solución salina}(0-180)} - ABC_{\text{prueba}(0-180)}}{ABC_{\text{solución salina}(0-180)}} \times 100$). Los resultados se muestran en la Tabla 5 y Figura 2.

Tabla 5

Resumen de parámetros farmacodinámicos después de la administración de derivados de GLP-1 PEGilados y exenatida en ratones diabéticos			
	GLP-1-amida-Q17-PEG _{20kDa}	GLP-1-amida-Q17-PEG _{30kDa}	Exenatida
Glu_{máx}	213,9 mg/dl	167,7 mg/dl	150,4 mg/dl
T_{glu<100 mg/dl}	60 min	60 min	60 min
HD %control	58,3 %	63,5 %	66,8 %

[0051] Los parámetros relacionados con la glucosa calculados para los primeros 180 minutos después de la administración de glucosa muestran que ambos productos de GLP-1-PEG, en particular GLP-1-PEG_{30kDa}, tienen una actividad similar a la de exenatida, probablemente debido a una resistencia a DPP-IV comparable.

[0052] La actividad estabilizante de la glucosa mostrada por la GLP-1-amida monopegilada de 20 kDa y 30 kDa hasta 8 horas después de una carga de glucosa oral es posiblemente debida a una combinación de elevada estabilidad proteolítica y reducción de la eliminación con una eficacia biológica final comparable o mejor que la mostrada por la exenatida.

[0053] Es otro objetivo de la presente invención proporcionar formulaciones farmacéuticamente aceptables para la administración de derivado monoconjugado específico de sitio de péptidos similares a GLP-1 con propiedades de miméticos de incretina descritas en la presente invención que se caracterizan por elevada estabilidad proteolítica y/o una mayor semivida circulante con respecto a péptidos no pegilados y son, por tanto, adecuados para reducir la hiperglucemia con pacientes diabéticos de tipo 2 basándose en la administración de una vez al día a tres veces a la semana.

[0054] En estas formulaciones, los análogos de GLP-1 monopegilados están presentes en una concentración de 0,1 a 50 mg/ml y en las que dichas formulaciones tienen un pH de 5 a 9, más preferentemente de 7 a 8. Estas formulaciones pueden comprender además sistemas tampón con o sin adición de agentes de tonicidad y quelantes, además de conservantes, estabilizadores y tensioactivos conocidos en la técnica. En una realización de la invención, tales formulaciones son disoluciones acuosas y/o suspensiones acuosas mientras que en otra realización son preparaciones en polvo obtenidas por cualquier método aceptable, preferentemente por liofilización.

[0055] Es otro objetivo de la presente invención proporcionar opciones de administración para la aplicación terapéutica de derivado monoconjugado específico de sitio de péptidos similares a GLP-1 con propiedades de miméticos de incretina descritas en la presente invención que son adecuadas para reducir la hiperglucemia con pacientes diabéticos de tipo 2 basándose en la administración de una vez a la semana a dos veces al mes mediante su incorporación en polímeros biodegradables o cualquier composición de polímero conocida en la técnica para la administración de proteínas y péptidos que permiten la liberación controlada y sostenida de péptidos GLP-1 insulíntrópicos mono-pegilados. Los sistemas para la administración a largo plazo de derivado monoconjugado específico de sitio de péptidos similares a GLP-1 descritos en la presente invención incluyen, entre otros, nano- y micro-partículas poliméricas orgánicas o inorgánicas, liposomas y vesículas similares a liposoma, nanopartículas de lípido, micropartículas basadas en hidrogel, polímeros y microemulsiones termosensibles y sensibles al pH conocidos en la técnica como se ejemplifica por las siguientes referencias básicas: Kohane DS, 2007; Lee KY y Yuk SH, 2007; Singh S et al., 2007; Jorgensen L et al., 2006; Schmaljohann D, 2006; Muller RH y Keck CM, 2004; Shina VR y Trehan A, 2003.

[0056] Una formulación de liberación sostenida de péptidos similares a GLP-1 monopegilados con propiedades de miméticos de incretina, descrita como ejemplo en la presente invención, puede prepararse incorporando el principio activo en Poloxamer 407 disuelto en tampón acetato a pH 4 a 4 °C. La cinética de liberación *in vitro* de una disolución al 22 % en peso/peso de Poloxamer 407 que contenía 0,3 mg/ml de GLP-1-amida Q17-PEG 20 kDa, estudiada incubando 1 ml de gel formulado a 37 °C con 1 ml de tampón acetato 0,2 M a pH 4,0 se muestra en la Figura 3. Las formulaciones basadas en Poloxamer, que pueden experimentar una transición a una fase de gel por encima de 18 °C, representan un sistema adecuado para la gelificación *in situ* tras la inyección subcutánea que va seguida de una lenta liberación en la circulación de los péptidos GLP-1 monopegilados.

[0057] Para un mejor entendimiento de la presente invención se proporcionan las siguientes definiciones.

[0058] Los términos GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) y análogos de GLP-1 según el uso de la presente invención significan el GLP-1 amidado del extremo C de 30 aminoácidos (SEC ID N° 1), el GLP-1 extendido por glicina en el extremo C de 31 aminoácidos (SEC ID N° 2) y sus formas biológicamente activas con delección, adición o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos, además de péptidos insulíntrópicos sintéticos o naturales con al menos el 40 % de identidad de secuencias con respecto a GLP-1 humano extendido por glicina en el extremo C de 31 aminoácidos de SEC ID N° 2.

[0059] Específicamente, para los análogos de péptidos GLP-1 como se usa en el presente documento, el término formas biológicamente activas significa que los productos actúan como miméticos de incretina porque pueden potenciar la secreción de insulina inducida por glucosa cuando se administran *in vivo*.

5 **[0060]** El término análogos de Q17N-GLP-1 (en los que Q y N son respectivamente la notación del código de una letra para glutamina y asparagina) según el uso de la presente invención significan GLP-1-amida o GLP-1 extendida por glicina en el extremo C que contiene un residuo de asparagina en la posición 17 y un residuo de glutamina individual en otras posiciones de la cadena peptídica.

10 **[0061]** A continuación, se facilitan algunos ejemplos experimentales con el fin de proporcionar una ilustración de la presente invención.

15 **[0062]** Los términos nano- y micro-partículas, según el uso de la presente invención, significan cualquier material polimérico inorgánico y orgánico con dimensiones que oscilan de 10 nanómetros a 100 micrómetros cargado con un fármaco con el fin de lograr una liberación controlada del principio activo como se describe, por ejemplo, por Kohane DS (2007), Lee KY y Yukn SH (2007), Muller RH y Keck CM (2004) y Shina VR y Trehan A (2003).

20 **[0063]** El término polímero termosensible según el uso de la presente invención significa cualquier material polimérico cuya transición de sol a gel está desencadenada por un aumento en la temperatura para formar un sistema de administración de liberación prolongada *in situ* de fármacos como se describe, por ejemplo, por Singh S et al. (2007), Schmalijohann D (2006).

Ejemplo 1

25 Mono-PEGilación específica de sitio directa de péptidos GLP-1 con m-PEG-amino 20 kDa, catalizada por Tgasa microbiana

30 **[0064]** Se disuelve un péptido GLP-1 en una disolución 10 mM, pH 8,0, de dihidrogenocitrato de sodio a la concentración de 0,5 mg de péptido/ml, correspondiente a una concentración de aproximadamente 150 µM. Entonces se añade m-PEG-amina 20 kDa (metoxipoliethylenglicol-amina 20000, Iris Biotech) a la disolución de péptido para lograr una relación molar 20:1 de PEG : GLP-1. Entonces se añade a la mezcla de reacción transglutaminasa microbiana (Activa WM, Ajinomoto) a una concentración final de 0,25 U /ml. La reacción se lleva a cabo bajo agitación durante 16 horas a temperatura ambiente.

35 **[0065]** Al final de la reacción, la disolución se diluye en un tampón acetato sódico 20 mM, pH 4,0, y se purifica por cromatografía en columna de intercambio iónico (Macrocap SP), eluyendo con un gradiente lineal de NaCl (de 0 a 500 mM en 10 volúmenes de columna). El conjunto de fracciones que contiene GLP-1 monopegilado se concentra, se desala y se liofiliza. El rendimiento de la monopegilación directa catalizada por enzima de péptidos GLP-1 es de aproximadamente el 60 %.

40 **[0066]** En la Figura 4 se informan RP-HPLC de alícuotas de la mezcla de reacción extraídas en los tiempos 0 y 16 horas, así como de GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa purificada.

Ejemplo 2

45 **[0067]** Intento de mono-PEGilación directa específica de sitio de GLP-1-amida con m-PEG-amino 20 kDa catalizada por Tgasa de cobaya.

50 **[0068]** Se disuelve GLP-1-amida en una disolución de TRIS 50 mM, pH 7,5, a una concentración de 0,5 mg de péptido/ml, correspondiente a una concentración de aproximadamente 150 µM. Entonces se añade m-PEG-amina de 20 kDa (metoxipoliethylenglicol-amina 20000, Fluka) a la disolución de proteína para lograr una relación molar 500:1 de PEG:GLP-1.

55 **[0069]** A la mezcla de reacción se añaden entonces 0,3 U/ml de transglutaminasa de cobaya (Sigma) y CaCl₂ 10 mM y la mezcla se mantiene bajo agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. La RP-HPLC realizada en la mezcla de reacción inicial y final solo mostró la presencia de GLP-1-amida sin reaccionar sin trazas de derivado pegilado.

Ejemplo 3

60 Intento de mono-PEGilación directa específica de sitio de la S12Q/Q17N-GLP-1-amida con m-PEG-amino 20 kDa catalizada por Tgasa microbiana

65 **[0070]** Se disuelve S12Q/Q17N-GLP-1-amida en una disolución 10 mM de dihidrogenocitrato de sodio, pH 8,0, a la concentración de 0,5 mg de péptido/ml, correspondiente a una concentración de aproximadamente 150 µM.

[0071] Entonces se añade m-PEG-amina de 20 kDa (metoxipoli(etilenglicol)-amina 20000, Iris Biotech) a la disolución de péptido para lograr una relación molar 20:1 de PEG : GLP-1. Entonces se añade a la mezcla de reacción transglutaminasa microbiana (Activa WM, Ajinomoto), a una concentración final de 0,25 U /ml. La reacción se lleva a cabo bajo agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. La RP-HPLC realizada en la mezcla de reacción de partida y final solo mostró la presencia de S12Q/Q17N-GLP-1-amida sin reaccionar sin trazas de derivado pegilado.

Ejemplo 4

Mono-PEGilación directa específica de sitio de Q17N/A24Q-GLP-1-amida con m-PEG-amino 20 kDa catalizada por Tgasa microbiana

[0072] Se disuelve Q17N/A24Q-GLP-1-amida en una disolución 10 mM de dihidrogenocitrato de sodio, pH 8,0, a la concentración de 0,5 mg de péptido/ml, correspondiente a una concentración de aproximadamente 150 μ M. Entonces se añade m-PEG-amina de 20 kDa (metoxipoli(etilenglicol)-amina 20000, Iris Biotech) a la disolución de péptido para lograr una relación molar 20:1 de PEG : péptido GLP-1. Entonces se añade a la mezcla de reacción transglutaminasa microbiana (Activa WM, Ajinomoto), a una concentración final de 0,25 U /ml. La reacción se lleva a cabo bajo agitación durante 16 horas a temperatura ambiente.

[0073] Al final de la reacción, la disolución se diluye en tampón acetato sódico 20 mM, pH 4,0, y se purifica por cromatografía en columna (Macrocap SP), eluyendo con un gradiente lineal de NaCl (de 0 a 500 mM en 10 volúmenes de columna). El conjunto de fracciones que contiene mutante de GLP-1 monopegilado se concentra, se desala y se liofiliza. El grado de la reacción de pegilación, además de la pureza del mutante de péptido GLP-1 monopegilado final, se comprueban por RP-HPLC. El rendimiento de la monopegilación directa catalizada por enzima de mutantes de GLP-1 es de aproximadamente el 60 %.

Ejemplo 5

[0074] Determinación de la estabilidad *in vitro* de derivados de GLP-1-PEG a la digestión por DPP-IV. Disoluciones de GLP-1-amida, GLP-1-amida monopegilada o mutantes de GLP-amida monopegilada o análogos en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de 0,1 mg/ml (calculada como equivalente del contenido de péptido) se mezclaron con DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV de riñón porcino, Sigma), 5 U/ ml de disolución de péptido y se incubaron a 37 °C. Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción en diferentes momentos de tiempo y se midió la degradación del péptido GLP-1 detectando el dipéptido del extremo N His-Ala eliminado por DPP-IV por análisis de RP-HPLC. La degradación enzimática se calculó para el título de His-Ala de cada muestra, como se muestra para el ejemplo en las Figuras 1.

Ejemplo 6

Determinación de la actividad biológica *in vitro* de GLP-1-amida, análogos de péptidos GLP-1 y sus derivados monopegilados.

[0075] Este ensayo se basa en la liberación de insulina, en presencia de glucosa y diferentes concentraciones de péptidos GLP-1 y sus derivados monopegilados, de células RIN-m5f derivadas de insulinoma de células beta de rata. Brevemente, se siembran 2×10^5 células en placas de 6 pocillos en medio RPMI completo y se incuban a 37 °C durante 2 días; las células se lavan, se incuban 4 horas más con medio con menor concentración de glucosa (0,2 %), luego se lavan de nuevo y se incuban durante 1 hora con una disolución 10 mM de péptidos GLP-1 o sus derivados monopegilados. Se recoge el sobrenadante y se determina el título de insulina liberada por ensayo de ELISA.

Ejemplo 7

Determinación de la actividad biológica *in vivo* de GLP-1-amida-Q17-PEG 5 kDa, GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa, GLP-1-amida-Q17-PEG 30 kDa.

[0076] Se examinaron la evaluación de los efectos estabilizantes de GLP-1-amida y sus derivados pegilados sobre la glucosa en plasma usando ratones diabéticos (*db/db*) de 7 a 10 semanas de edad. Se retiró la comida durante un periodo de 18 h antes de y durante 3 horas después de la administración por vía oral de una disolución de glucosa (1,5 g/kg de peso corporal); la comida se retiró de nuevo 6 horas después de la administración de glucosa. Se administraron 40 μ g/ml de productos que iban a probarse y control negativo (solución salina tamponada con fosfato) por inyección subcutánea de un volumen de 2,5 ml/kg de peso corporal, 30 minutos antes de la administración de glucosa. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola de ratones conscientes antes de la inyección y 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 1440 min después de la inyección y se midió la concentración de glucosa por el medidor de glucosa Ascensia Elite (Bayer). Los resultados de un experimento llevado a cabo con GLP-1-amida monopegilada de 20 kDa y 30 kDa en comparación con exenatida y un control de solución salina se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 8

Preparación y ensayo de liberación *in vitro* de la formulación de Poloxamer de liberación sostenida de GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa

[0077] Se preparó una disolución al 27 % de Poloxamer 407 por disolución lenta del polímero en tampón acetato 0,2 M a pH 4,0 a 4 °C. Se añadió GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa para obtener una concentración final de 0,3 mg/ml de GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa y 22 % de Poloxamer y la disolución se almacenó a 4 °C.

[0078] Se realizó una prueba de disolución incubando 1 ml del gel formado a 37 °C con 1 ml de tampón acetato 0,2 M a pH 4,0. La disolución se recogió y se substituyó con un volumen equivalente de tampón en diferente momento de tiempo, con el fin de evaluar la liberación de GLP-1-amida-Q17-PEG 20 kDa por análisis de RP-HPLC. Los resultados de la prueba de disolución se muestran en la Figura 3.

REFERENCIAS**[0079]**

- Adelhorst K, et al. (1994) Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1. J.Biol.Chem. 269, 6275-6278
- Ando H et al. (1989) Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Agric.Biol.Chem. 53, 2613-2617
- Bloom M. et al. (2003) Albugon fusion protein: a long acting analogue of GLP-1 that provides lasting antidiabetic effect in animal. Diabetes 52 (Suppl.1), Abstract A112
- Buckley DI et al. GLP-1 analogues useful for diabetes treatment.US5545618 Choi S et al. (2004) Control of blood glucose by novel GLP-1 delivery using biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA in type 2 diabetic rats. Pharmac.Res. 21, 827-831
- Cousson PJ et al. (1992) Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides. Biochem. J., 282, 929-930
- Davidson MB et al. (2005) Exenatide. Nature Rev. Drug Discovery 4, 713-714
- Davis FF et al. Non immunogenic polypeptides. US4179337
- Delgado C et al. (1992) The uses and properties of PEG-linked proteins, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9, 249-304
- Drucker DJ. (2001) The glucagon-like peptides. Endocrinology 142, 521-527
- Eng J et al. (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue from Heloderma suspectum venom. J.Biol.Chem. 267, 7402-7405
- Esposito C, Caputo I (2004) Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. FEBS J. 272, 615-631
- Fontana A et al. (2008) Site specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 13-28
- Fuchsbaue H et al. Bacterial transglutaminases. EP 1068301
- Gallwitz B et al. (1994) Structure/activity characterization of glucagon-like peptide-1. Eur. J. Biochem. 225, 1151-1156
- Greenwald RB et al. (2003) Effective drug delivery by PEGylated drugs conjugates. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 217-250
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol. Rev. 87, 1409-1439, 2007
- Johansen L et al. Transglutaminase mediated conjugation of peptides. WO070468
- Jorgensen L et al. (2006) Preparing and evaluating delivery systems for proteins. Eur. J. Pharmac. Sci. 29, 174-182
- Kaiser ET (1989) Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes. Acc. Chem. Res. 22, 47-54
- Kinstler OB et al. N-terminally chemically modified protein compositions and methods. US5985265
- Kinstler OB et al. (1996) Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF, Pharmac. Res. 13, 996-1002
- Knudsen LB et al. GLP-1 derivatives. EP0944648
- Knudsen LB et al. (2000) Potent derivatives of glucagon-like-peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. J. Med. Chem. 43, 1664-1669
- Kohane DS (2007) Microparticles and nanoparticles for drug delivery. Biotechnol. Bioengn. 96, 203-209
- Kobayashi K et al. (1996) Epsilon-(gamma-glutamyl) lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in Bacillus subtilis. FEMS Microbiol. Lett. 144, 157-160
- Kobayashi K et al. (1998) Molecular cloning of the transglutaminase gene from Bacillus subtilis and its expression in Escherichia coli. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1109-1114
- Lee SH et al. (2005) Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1. Bioconjug. Chem. 16, 377-382
- Lee KY, Yuk SH (2007) Polymeric protein delivery systems. Progress Polymer Sci. 32, 669-697
- Merrifield B (1986) Solid phase synthesis. Science 232, 241-247
- Muller RH, Keck CM (2004) Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs. A review of drug

nanocrystal technology and lipid nanoparticles. J. Biotechnol. 113, 151-170

Nucci ML et al. (1991) The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins, Adv. Drug Deliv. Rev. 6, 133-151

Ohtsuka T et al. (2000) Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines, J. Agric. Food Chem. 48, 6230-6233

Ohtsuka T et al. (2000) Comparison of substrate specificities of transglutaminase using synthetic peptides as acyl donors. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2608-2613

Parveen S, Sahoo SK (2006) Clinical application of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. Clin. Pharmacokinet. 45, 965-988

Pastor MT et al. (1999) Addressing substrate glutamine requirements for tissue transglutaminase using substance P analogues. FEBS Lett. 451, 231-2134

Ritzel U et al. (1998) A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability. J. Endocrinol. 158, 93-102

Roberts MJ et al. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation, Adv. Drug Deliv. Rev. 54,459-476

Sambrook J et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sato H et al. (2000) Transglutaminase-mediated dual and site-specific incorporation of poly(ethylene glycol) derivatives into a chimeric interleukin-2. Bioconjug. Chem. 11, 502-509

Sato H (2002) Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 487-504

Schmaljohann D (2006) Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev. 58, 1655-1670

Schnabel CA et. (2006) Immunogenicity of xenopeptide hormone therapy. Peptides 27, 1902-1910

Shina VR, Trehan A (2003) Biodegradable microspheres for protein delivery. J. Control. Rel. 90, 261-280

Singh S et al. (2007) Thermosensitive polymers: Synthesis, characterization, and delivery of proteins. Internat. J. Pharmac. 341, 68-77

Takahara Y. Modification of peptide and protein. EP785276

Takahara Y et al. Modification of peptide and protein. US6010871

Veronese et al. Novel G-CSF conjugates WO2005099769

Thornton K, Gorenstein DG (1994) Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. Biochemistry 33, 3532-3539

Uçkaya G et al. (2005) Improvement of metabolic state in an animal model nutrition-dependent typ 2 diabetes following treatment with S 23521, a new glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue. J. Endocrinol. 184, 503-513

Yokoyama K et al. (2000) Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, *in vitro* refolding and characterization of the refolded form. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1263-1270, 2000

Youn YS et al. (2007) Evaluation of therapeutic potentials of site-specific PEGylated glucagon-like peptide-1 isomers as type 2 anti-diabetic treatment. Insulinotropic activity, glucose-stabilizing capability and proteolytic stability. Biochem. Pharmacol. 73, 84-93

Zalipski S (1995) Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules, Adv. Drug Deliv. Rev. 16, 157-182

REIVINDICACIONES

1. Derivado monoconjugado de un péptido 1 similar al glucagón o análogos de GLP-1 seleccionados del grupo que consiste en GLP-1 (7-36) amida (SEC ID N° 1), GLP-1 (7-37) extendido por glicina (SEC ID N° 2), exendina-3 y exendina-4 que tiene un residuo de glutamina ligado covalentemente a un monometoxi-poli(etilenglicol) lineal o ramificado funcionalizado con alquilamino primario, **caracterizado por que** dicho péptido 1 similar al glucagón o análogos de GLP-1 seleccionados del grupo que consiste en GLP-1 (7-36) amida (SEC ID N° 1), GLP-1 (7-37) extendido por glicina (SEC ID N° 2), exendina-3 y exendina-4 y dicho monometoxi-poli(etilenglicol) están directamente ligados.
2. Derivado monoconjugado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho monometoxi-poli(etilenglicol) lineal o ramificado funcionalizado con un grupo amino primario tiene un peso molecular de 2 a 50 kDa, preferentemente de 5 a 40 kDa.
3. Derivado monoconjugado según la reivindicación 2, **caracterizado por que** dicho monometoxi-poli(etilenglicol) lineal o ramificado funcionalizado con un grupo amino primario tiene un peso molecular de 10 a 30 kDa, preferentemente de 15 a 25 kDa, más preferentemente de aproximadamente 20 kDa.
4. Derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado por que** el residuo de glutamina en la posición 17 de dicha GLP-1 (7-36) amida (SEC ID N° 1) o GLP-1 (7-37) extendido por glicina (SEC ID N° 2) está ligado covalentemente a dicho polímero funcionalizado con alquilamino, o por que la glutamina en la posición 17 está sustituida con una asparagina y la alanina en la posición 24 está sustituida con una glutamina y está ligada covalentemente al polímero funcionalizado con alquilamino.
5. Un derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de diabetes, preferentemente diabetes de tipo 2.
6. Un derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para reducir hiperglucemia en pacientes afectados por diabetes, preferentemente diabetes de tipo 2.
7. Una formulación que contiene un derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con al menos un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
8. Una formulación que contiene un derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con nano- y micro-partículas poliméricas y/o lipídicas.
9. Una formulación que contiene un derivado monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con un polímero termosensible.
10. Un proceso para la preparación de un derivado monoconjugado según una cualquiera de la reivindicación 1 a 4, que comprende hacer reaccionar un péptido 1 similar al glucagón o análogos de GLP-1 seleccionados del grupo que consiste en GLP-1 (7-36) amida (SEC ID N° 1), GLP-1 (7-37) extendido con glicina (SEC ID N° 2), exendina-3 y exendina-4 con un monometoxi-poli(etilenglicol) lineal o ramificado funcionalizado con alquilamino primario en presencia de una transglutaminasa microbiana, en el que dicho proceso es una reacción de conjugación directa.
11. Un proceso según la reivindicación 10, **caracterizado por que** la relación molar de péptido 1 similar al glucagón:polímero funcionalizado con alquilamino comprende entre 1:1 y 1:100, preferentemente entre 1:5 y 1:35, más preferentemente entre 1:15 y 1:25.
12. Un proceso según las reivindicaciones 10 y 11, **caracterizado por que** dicha reacción se lleva a cabo en una disolución tamponada a un pH de entre 4 y 9, preferentemente de entre 5 y 8.
13. Un proceso según las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado por que** dicha transglutaminasa se usa en cantidades que oscilan entre 0,1 y 2 U/ml, preferentemente entre 0,2 y 1 U/ml.
14. Un proceso según las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado por que** dicha reacción se lleva a cabo a una temperatura de entre 10 y 50 °C, preferentemente de entre 15 y 30 °C.

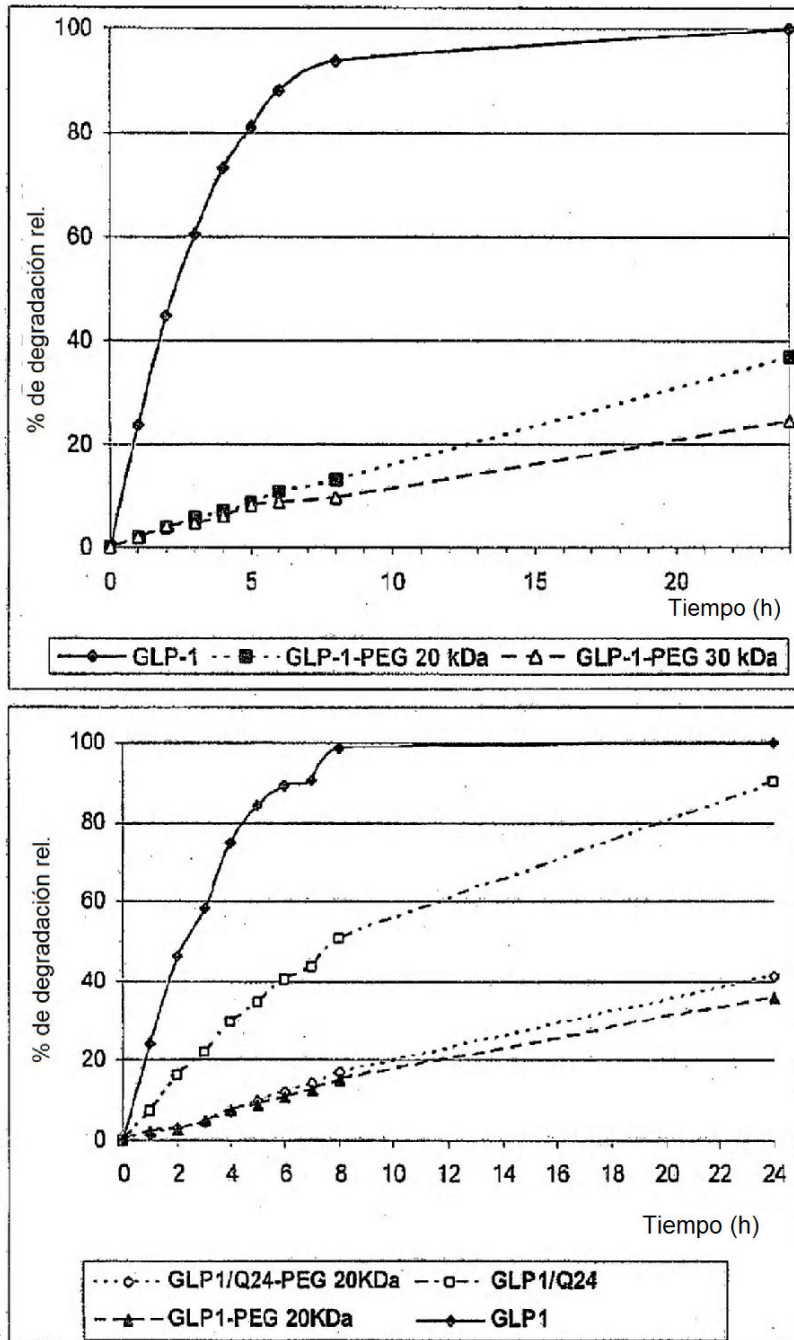


Figura 1: Perfiles de degradación por DPP-IV *in vitro* de GLP-1-amida (♦); Q17N-A24Q-GLP-1-amida () y los derivados monopegilados de 20 kDa correspondientes de GLP-1-amida (▼) y Q17N-A24Q-GLP-1-amida (◇).

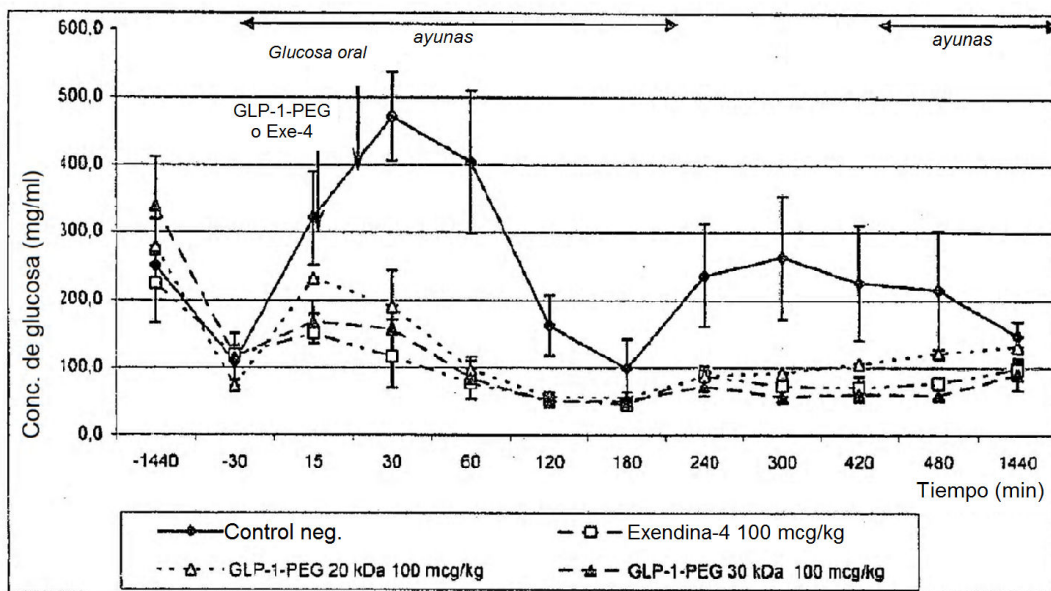


Figura 2: Perfil estabilizante de glucosa en ratones db/db diabéticos de tipo 2 después de la administración intraperitoneal de GLP-1-amida monopegilada con Q17 de 20 kDa (Δ) y 30 kDa ($\blacktriangle$) y exenatida ($\square$) (tiempo - 30 min, 100 μ /kg) y la administración oral de glucosa (tiempo 0 min; 1,5 g/kg).

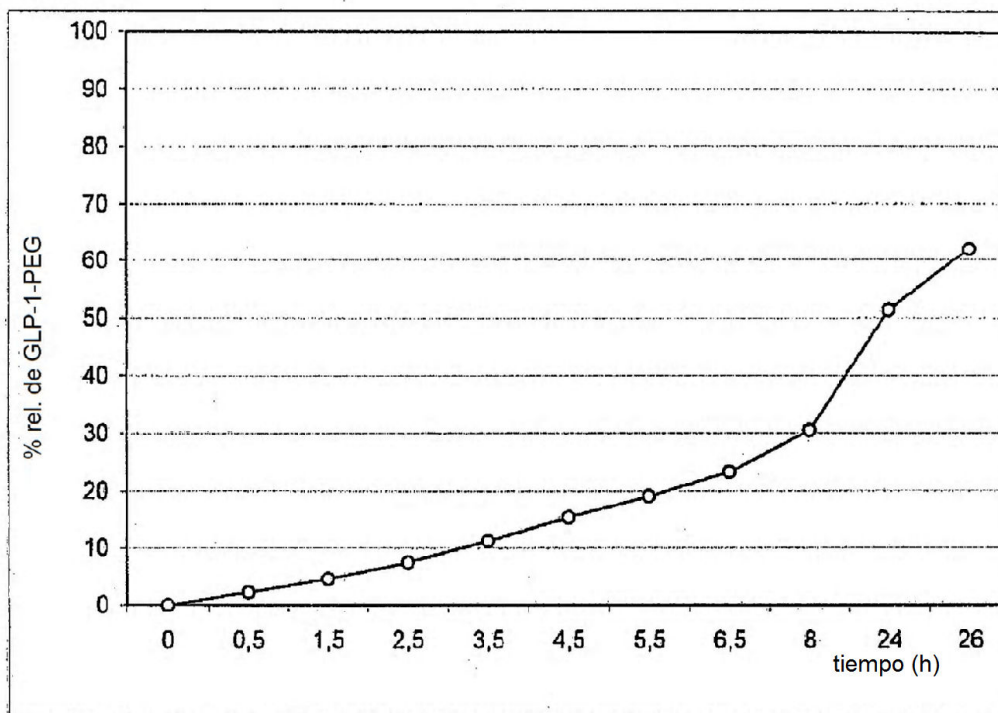


Figura 3: Liberación *in vitro* de GLP-1-amida monopegilada de 20 kDa una preparación de gel termorreversible que contiene 22 % de Poloxamer 407 incubada a 37 °C en tampón fosfato.

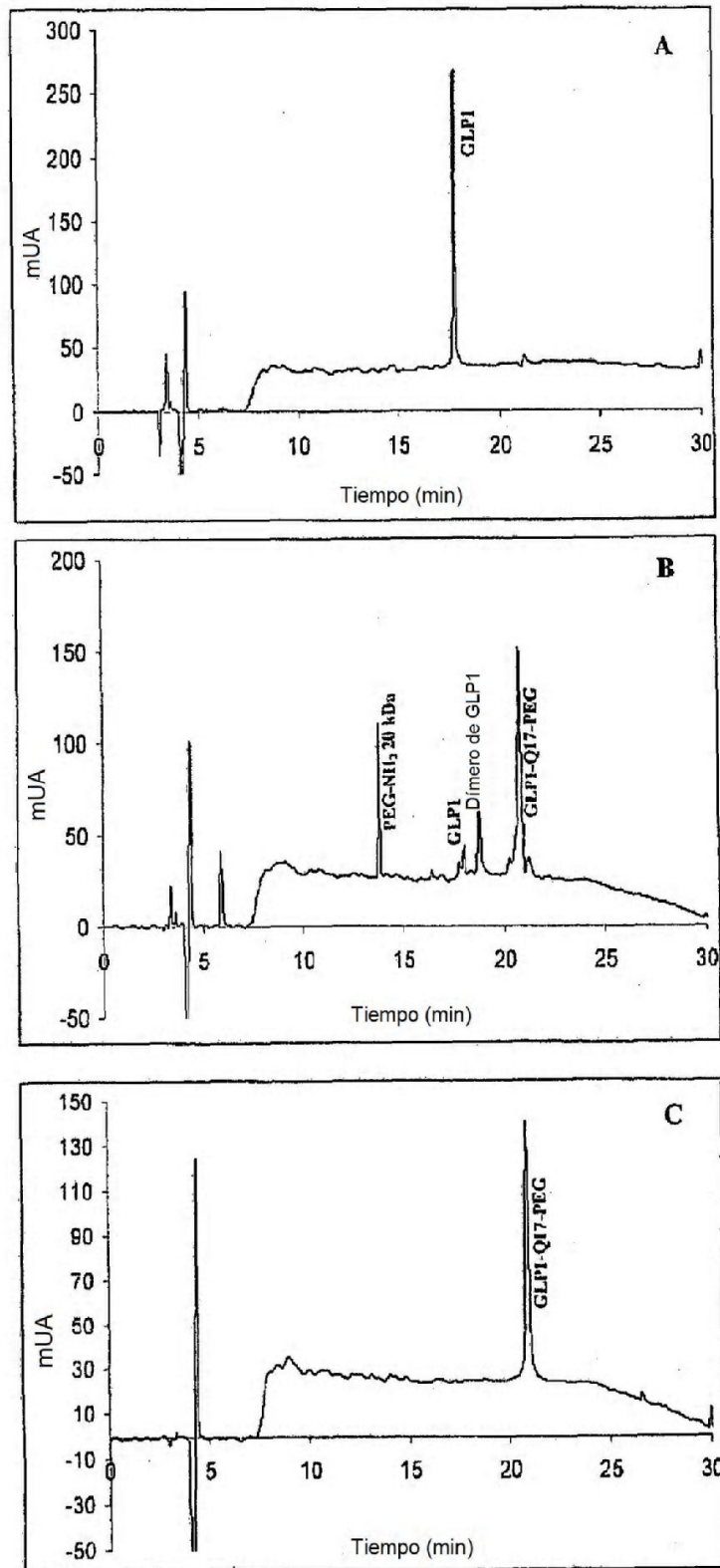


Figura 4: Análisis de RP-HPLC de GLP-1-amida nativa (panel A), mezcla de reacción de la pegilación directa de GLP-1-amida con m-PEG-amino de 20 kDa catalizado por M-Tgasa después de 16 horas a temperatura ambiente (panel B) y GLP1-amida-Q17-PEG 20 kDa purificada por cromatografía en columna de intercambio iónico (panel C).