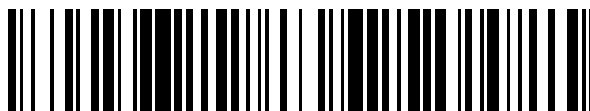


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 734**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/EP2011/066097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12035139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11757861 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2616102**

54 Título: **Profármacos que comprenden un conjugado exendina enlazador**

30 Prioridad:

17.09.2010 EP 10177327

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)
Brüningstraße 50
65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**CLEEMANN, FELIX;
HERSEL, ULRICH;
LESSMANN, TORBEN y
RAU, HARALD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 733 734 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

Profármacos que comprenden un conjugado exendina enlazador.

La presente invención se refiere a profármacos de exendina, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos, así como profármacos de exendina para su uso como un medicamento para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante exendina.

La exendina-4 es un péptido de 39 aminoácidos que se aísla de las secreciones salivales del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*). Tiene alguna similitud de secuencia con varios miembros de la familia de péptidos similares a glucagón, donde la mayor homología de 53 % es con respecto al péptido-1 [7-36]-amida similar a glucagón (GLP-1). La exendina-4 actúa como un agonista de GLP-1 sobre el receptor de GLP-1 e incluye acción de secretagogo de insulina similar a GLP-1 en islotes de rata aislados. La exendina-4 es un agonista de potencia elevada y la exendina-(9-39)-amida troncada es un antagonista en el receptor del péptido 1-(7-36)-amida similar a glucagón de células beta que secretan insulina. (véase, p. ej., J; Biol. Chem. 268(26):19650-19655). La exendina-4 ("exenatida") recibió recientemente la aprobación en EE. UU. y la UE para mejorar el control glicémico en pacientes con diabetes tipo 2 que toman metformina y/o una sulfonilurea, pero que no han logrado un control glicémico adecuado.

El tratamiento actual con exenatida requiere inyecciones frecuentes (dos veces al día), lo que resulta en niveles en plasma altos después de la inyección, lo que se correlaciona con náuseas (véase Nauck M. A., Meier J. J. (2005), Regul Pept.128(2):135-148), y a concentraciones valle bajas, que conducen a un control glicémico incompleto (véase Kim D., et al. (2007), Diabetes Care. 30(6):1487-1493). Para superar estos problemas, es muy deseable una formulación de larga duración para exendina-4.

De manera ideal, el péptido se formula de manera que proporciona un nivel en plasma sostenido en humanos durante al menos una semana después de la aplicación a un cuerpo humano, que resulta en una frecuencia de inyección de una vez a la semana o más extensa. Se han propuesto diversas exendinas de acción prolongada. Para potenciar las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco in vivo, tal como su semivida, dicho fármaco se puede conjugar con un vehículo. Si el fármaco se une transitoriamente a un vehículo y/o un enlazador, dichos sistemas se denominan comúnmente profármacos enlazados a vehículo. Según las definiciones proporcionadas por IUPAC (como las proporcionadas en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem>, último acceso el 22 de julio de 2009), un profármaco enlazado a vehículo es un profármaco que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo vehículo transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y se puede retirar fácilmente *in vivo*, normalmente mediante una escisión hidrolítica.

Los enlazadores empleados en dichos profármacos enlazados a vehículo pueden ser transitorios, lo cual significa que son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables (escindibles) en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas que varían de, por ejemplo, una hora a tres meses. Los vehículos adecuados son polímeros y se pueden conjugar directamente con el enlazador o a través de un espaciador no escindible.

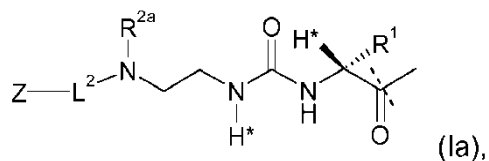
La conjugación del polímero transitoria a través de enlazadores de profármaco que no dejan trazas combina las ventajas de tiempo de circulación prolongados debido al acoplamiento del polímero y la recuperación de la farmacología original del péptido natural después de la liberación del conjugado con el polímero.

Mediante el uso de conjugados peptídicos con enlazador polimérico, el péptido natural inalterado se libera lentamente después de la aplicación a un paciente, regido solo por la cinética de liberación del enlazador y la farmacocinética del vehículo polimérico. De manera ideal, la cinética de liberación sería independiente de la presencia de enzimas como proteasas o esterasas en fluidos corporales para garantizar un patrón de liberación consistente y homogéneo.

La solicitud de patente internacional WO-A 2009/095479 se refiere a profármacos que comprenden conjugados de fármaco enlazador, donde el enlazador se acopla covalentemente a través de una unión escindible a un resto biológicamente activo, tal como exendina. El resto biológicamente activo se libera del profármaco tras la activación por ciclización mediante la formación de imida cíclica. Se describe un profármaco de exendina en el que el enlazador se basa en L-alanina.

Todavía existe la necesidad del desarrollo de profármacos de exendina de acción prolongada con semividas más extensas. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar profármacos de exendina con semividas más extensas.

Esto se logra mediante un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable de este que comprende un profármaco de exendina covalente de fórmula D-L, en donde D representa un resto exendina; y -L es un resto enlazador no biológicamente activo -L¹ se representa mediante la fórmula (Ia),



en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

5 R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₄;

R^{2a} se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄;

en donde

L² es una unión química simple o un espaciador; y

Z es un hidrogel;

10 en donde el hidrogel es una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de captar grandes cantidades de agua, compuesta por homopolímeros o copolímeros, que son insolubles debido a la presencia de retículos químicos o físicos covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, entrelazamientos);

15 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida.

20 Se halló que los enlazadores de profármaco basados en la estereoquímica que se muestra en la fórmula (I), es decir, con un aminoácido en su forma D, tienen una semivida ventajosa en comparación con los enlazadores de profármaco basados en aminoácidos en su forma L. Además, dichos profármacos pueden proporcionar la liberación de exendina desde un depósito subcutáneo en forma estructuralmente intacta durante períodos de tiempo de al menos 2 días entre administraciones. Como ventaja adicional, se puede proporcionar integridad estructural de la exendina liberada mediante una matriz polimérica bien hidratada que minimiza el contacto intermolecular de las moléculas de exendina y se puede posibilitar la liberación sostenida por medio de un enlazador de profármaco autoescindible entre la exendina y la matriz polimérica.

25 Por lo tanto, debería ser posible administrar exendina en forma de un profármaco de la presente invención menos frecuentemente que las exendinas de acción prolongada actuales. Las ventajas adicionales deberían ser una relación de pico a valle pequeña, que reduce en gran medida el riesgo de eventos adversos, tales como náuseas y complicaciones gastrointestinales. Esto puede ayudar a los pacientes a reducir la frecuencia de las inyecciones, mientras se puede mantener el control óptimo de los niveles en plasma de exendina y, en consecuencia, la glucosa en sangre.

30 El término "exendina" se refiere a un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida. Preferiblemente, la exendina es una exendina o un agonista de exendina de la ID de secuencia 1 a ID 21 (véase más adelante) y, más preferiblemente, es exendina-3 que tiene la ID de secuencia 2 o exendina-4 que tiene la ID de secuencia 1.

35 El término "extendido" se refiere a péptidos o proteínas que tienen residuos aminoacídicos adicionales en su extremo N o extremo C o que tienen inserciones internas. El término también se refiere a fusiones de dichos péptidos o proteínas con otros péptidos o proteínas, tal como, por ejemplo, la proteína GST, el péptido FLAG, el péptido hexa-his, la proteína de unión a maltosa.

40 Los ejemplos de agonistas de exendina, según se usan en la presente memoria, son los agonistas de exendina-3 o exendina-4 que incluyen, pero no se limitan a:

45 (i) análogos de exendina-4 y análogos de exendina-4 amidados, en cuyas secuencias uno o más residuos aminoacídicos se han reemplazado por diferentes residuos aminoacídicos que incluyen modificaciones en el extremo N;

(ii) formas truncadas y extendidas de exendina-4 y formas truncadas y extendidas que están amidadas;

(iii) exendina-4 truncada y extendida y formas truncadas y extendidas que están amidadas, en cuyas secuencias uno o más residuos aminoacídicos se han reemplazado por diferentes residuos aminoacídicos;

(iv) GLP-I y GLP-I amidado;

(v) análogos de GLP-I y análogos de GLP-I amidados, en cuyas secuencias uno o más residuos aminoacídicos se han reemplazado por diferentes residuos aminoacídicos que incluyen modificaciones en el extremo N;

(vi) GLP-I truncado y extendido y formas truncadas y extendidas que están amidadas;

5 (vii) GLP-I truncado y formas truncadas que están amidadas, en cuyas secuencias uno o más residuos aminoacídicos se han reemplazado por diferentes residuos aminoacídicos;

(viii) las sustancias ya conocidas AVE-0010/ZP-10/Lixisenatida (Sanofi-Aventis Zealand Pharma; ID de secuencia 21), BAY-73-7977 (Bayer), TH-0318, BIM-51077 (Ipsen, Tejin, Roche), NN2211 (Novo Nordisk), LY315902.

10 Los ejemplos de agonistas de exendina, según se describieron anteriormente, pueden ser aquellos en que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende

H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,

H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y

H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,

o una sal farmacológicamente tolerable de estos.

15 Los ejemplos adicionales de agonistas de exendina, según se describieron anteriormente, pueden ser aquellos en los que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende

desPro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4 (1-39),

desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),

20 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),

desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),

desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),

25 o una sal farmacológicamente tolerable de estos.

Los ejemplos adicionales de agonistas de exendina, según se describieron en el párrafo anterior, pueden ser aquellos en los que el péptido -Lys₆-NH₂ se acopla a los extremos C de los análogos de exendina-4.

Los ejemplos adicionales de agonistas de exendina, según se describieron anteriormente, pueden ser aquellos en que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende

30 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

35 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39) -NH₂,

40 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,

- H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 5 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 10 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

- H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
 15 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39) -NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 20 o una sal farmacológicamente tolerable de estos.

Un ejemplo adicional de un agonista de exendina, según se describió anteriormente, es Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida] o una sal farmacológicamente tolerable de este.

- Los agonistas de exendina imitan las actividades de exendina-3 o exendina-4 al unirse al(a los) receptor(es) en el(los) que la exendina-3 o exendina-4 ejerce sus acciones que son beneficiosas como insulínótropicas y en el
 25 tratamiento de la diabetes mellitus o al imitar los efectos de la exendina en el flujo de orina, el vaciado gástrico lento, inducir la saciedad, aumentar la excreción de sodio urinaria y/o disminuir la concentración de potasio urinaria, al unirse al(a los) receptor(s) donde la exendina causa estos efectos.

En una realización, la exendina o agonistas de exendina con las ID de secuencia NOs: 1-22 se pueden usar para preparar los conjugados poliméricos de acción prolongada de la invención:

- 30 [Seq ID No:1] Exendina-4
 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2
- [Seq ID No:2] Exendina-3
 HSDGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2
- 35 [Seq ID No:3]
 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG P
- [Seq ID No:4]
 40 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG Y
- [Seq ID No:5]
 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG
- 45 [Seq ID No:6]
 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG-NH2

- [Seq ID No:7]
HGEFTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKN-NH2
- 5 [Seq ID No:8]
HGEFTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKNGG PSSGAPPPS-NH2
- [Seq ID No:9]
HGEFTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKN-NH2
- 10 [Seq ID No:10]
HGEFTFTSDL SKQLEEEAVR LAIEFLKN-NH2
- [Seq ID No:11]
HGEFTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2
- 15 [Seq ID No: 12]
HGDGFTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2
- [Seq ID No 13] GLP-I (7-36) amida
20 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
- [Seq ID No 14]
HSEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
- 25 [Seq ID No 15] GLP-I (7-37)
HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGRG
- [Seq ID No 16]
30 HAXaaGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
Xaa=P, F, Y
- [Seq ID No 17]
HXaaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
35 Xaa = T, ácido α-aminobutírico, D-Ala, V, Gly
- [Seq ID No 18]
HaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGG
- [Seq ID No 19]
40 R-HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
R = acetilo, piroglutamilo, N-2-hidroxibenzoilo, N-trans-3-hexenoilo
- [Seq ID No 20]
45 HXaaAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2
Xaa = 6-amino-hexanoilo.
- [Seq ID No 21] AVE-0010/ZP-10/Lixisenatida
HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-NH2
- [Seq ID No 22] Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida]
50 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAXaaEFlAWLVVRGRG
Xaa = Lys(N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil)))
- Preferiblemente, la exendina es la que tiene la secuencia ID 1, ID 13, ID 15, ID 21 o ID 22.
- Más preferiblemente, la exendina es la que tiene la secuencia ID 1, ID 13 o ID 21.
- 55 En una realización, la exendina es exendina-4 que tiene la secuencia ID 1.
- En otra realización, la exendina es un análogo que tiene la secuencia ID 13.
- En otra realización, la exendina es un análogo que tiene la secuencia ID 21.
- La exendina y derivados agonistas de exendina de la invención ejercerán todas y cualesquiera actividades exhibidas por la molécula genitora no modificada, pero con una acción prolongada.
- 60 La exendina unida a un enlazador no biológicamente activo se denomina "resto de exendina".

"Enlazador no biológicamente activo" significa un enlazador que no exhibe los efectos farmacológicos del fármaco derivado del agente biológicamente activo.

5 "Grupos protectores" se refiere a un resto que protege temporalmente un grupo químico funcional de una molécula durante la síntesis para obtener quimioselectividad en reacciones químicas posteriores. Los grupos protectores para alcoholes son, por ejemplo, bencilo y tritilo, los grupos protectores para aminas son, por ejemplo, terc-butiloxycarbonilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo y bencilo y para tioles los ejemplos de grupos protectores son 2,4,6-trimetoxibencilo, feniltiometilo, acetamidometilo, p-metoxibenciloxycarbonilo, terc-butiltio, trifenilmetilo, 3-nitro-2-piridiltio, 4-metiltritilo.

"Grupos funcionales protegidos" significa un grupo químico funcional protegido por un grupo protector.

10 "Agente acilante" significa un resto de la estructura R-(C=O)-, que proporciona el grupo acilo en una reacción de acilación, opcionalmente conectado a un grupo saliente, tal como cloruro ácido, N-hidroxi succinimida, pentafluorfenol y para-nitrofenol.

"Alquilo" significa una cadena de carbono lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo se puede reemplazar por un sustituyente.

15 "Ariolo" se refiere a cualquier sustituyente derivado de un anillo aromático monocíclico o policíclico o fusionado, incluidos anillos heterocíclicos, p. ej., fenilo, tiofeno, indolilo, naftilo, piridilo, que opcionalmente se pueden sustituir adicionalmente.

"Acilo" significa un grupo químico funcional de la estructura R-(C=O)-, en donde R es un alquilo o ariolo.

20 "Alquilo C₁₋₄" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 4 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, o p. ej. -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están enlazados mediante el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₄ se puede reemplazar por un sustituyente.

25 "Alquilo C₁₋₆" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 6 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: alquilo C₁₋₄, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo; terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo o, p. ej., -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están enlazados mediante el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₆ se puede reemplazar por un sustituyente.

30 Por consiguiente, "alquilo C₁₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene 1 a 18 átomos de carbono y "alquilo C₈₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene 8 a 18 átomos de carbono. Por consiguiente, "alquilo C₁₋₅₀" significa una cadena de alquilo que tiene 1 a 50 átomos de carbono.

35 "Alquenilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que tiene 2 a 50 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂ o, p. ej., -CH=CH-, cuando dos restos de una molécula están enlazados mediante el grupo alquenilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquenilo C₂₋₅₀ se puede reemplazar por un sustituyente, según se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alquenilo" se refiere a una cadena de carbono con al menos un enlace doble carbono-carbono. Opcionalmente, se pueden producir uno o más enlaces triples.

40 "Alquinilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que tiene 2 a 50 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃ o, p. ej., -C≡C-, cuando dos restos de una molécula están enlazados mediante el grupo alquinilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquinilo C₂₋₅₀ se puede reemplazar por un sustituyente, según se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alquinilo" se refiere a una cadena de carbono con al menos un enlace triple carbono-carbono. Opcionalmente, se pueden producir uno o más enlaces dobles.

45 "Cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo cicloalquilo C₃₋₇" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene 3 a 7 átomos de carbono, que puede tener enlaces dobles carbono-carbono que están al menos parcialmente saturados, p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono de cicloalquilo se puede reemplazar por un sustituyente. El término "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo cicloalquilo C₃₋₇" también incluye bicíclo puenteados como norbonano o norboneno. Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₅" significa un cicloalquilo que tiene 3 a 5 átomos de carbono.

50 Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₁₀" significa un alquilo cíclico que tiene 3 a 10 átomos de carbono, p. ej., cicloalquilo C₃₋₇; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo, ciclodecilo. El término "cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye carbomono- y -bicíclo al menos parcialmente saturados.

"Halógeno" significa fluoro, cloro, bromo o yodo. Se prefiere generalmente que el halógeno sea fluoro o cloro.

"Heterocíclico de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 o 7 átomos del anillo que puede contener hasta la cantidad máxima de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático que está

completamente, parcialmente o no saturado) en donde al menos un átomo del anillo hasta 4 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluidos -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluido =N(O)-) y en donde el anillo se enlaza con el resto de la molécula a través de un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos para heterociclos de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tietano, furano, 5 tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepano, azepina o homopiperazina.

10 "Heterobicyclilo de 9 a 11 miembros" o "heterobicyclo de 9 a 11 miembros" significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos del anillo, donde ambos anillos comparten al menos un átomo de anillo y puede contener hasta la cantidad máxima de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático que está completamente, parcialmente o no saturado) en donde al menos un átomo del anillo hasta 6 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluidos -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluido =N(O)-) y en 15 donde el anillo se enlaza con el resto de la molécula a través de un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos de un heterobicyclo de 9 a 11 miembros son indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, quinolina, dihidroquinolina, tetrahidroquinolina, decahidroquinolina, isoquinolina, decahidroisoquinolina, tetrahidroisoquinolina, dihidroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. El término heterobicyclo de 9 a 11 miembros también incluye 20 estructuras espiral de dos anillos como 1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decano o heterociclos puenteados como 8-azabicyclo[3.2.1]octano.

En caso de que los profármacos de exendina que comprenden los compuestos según la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus sales farmacéuticamente o toxicológicamente aceptables correspondientes, en particular, sus sales farmacéuticamente utilizables. Por lo tanto, los profármacos de 25 exendina que comprenden los compuestos de la fórmula (I) que contienen grupos ácidos se pueden usar según la invención, por ejemplo, como sales de metal alcalino, sales de metal alcalinotérreo o como sales de amonio. Los ejemplos más precisos de dichas sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoniaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanol, trietanolamina o aminoácidos. Los profármacos de exendina que comprenden los compuestos de la fórmula (I) que contienen uno o más grupos 30 básicos, es decir, grupos que pueden estar protonados, pueden estar presentes y se pueden usar según la invención en la forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, 35 ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico, y otros ácidos conocidos para el experto en la técnica. Si los profármacos de exendina que comprenden los compuestos de la fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betáinas (zwitteriones). Las respectivas sales según los 40 profármacos de exendina que comprenden la fórmula (I) se pueden obtener mediante métodos habituales que son conocidos para el experto en la técnica como, por ejemplo, al ponerlas en contacto con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o mediante intercambio aniónico o intercambio catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de profármacos de exendina que comprenden los compuestos de la fórmula (I) que, debido a la baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en 45 productos farmacéuticos, pero que se pueden usar, por ejemplo, como intermediarios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

Para potenciar las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco, tal como exendina, *in vivo*, dicho fármaco se puede conjugar con un vehículo. Si el fármaco se une transitoriamente a un vehículo y/o un enlazador, dichos sistemas se denominan comúnmente profármacos enlazados a vehículo. Según las definiciones 50 proporcionadas por IUPAC (como las proporcionadas en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac.medchem>, último acceso el 22 de julio de 2009), un profármaco enlazado a vehículo es un profármaco que contiene un enlace temporal de una sustancia activa dada con un grupo vehículo transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y se puede retirar fácilmente *in vivo*, normalmente mediante una escisión hidrolítica.

Los enlazadores empleados en dichos profármacos enlazados a vehículo son transitorios, lo cual significa que son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables (escindibles) en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 55 37 °C) con semividas que varían de, por ejemplo, una hora a tres meses.

Los vehículos de hidrogel se pueden conjugar directamente con el enlazador L o a través de un espaciador, preferiblemente un espaciador no escindible. El término "profármaco de hidrogel de exendina" se refiere a profármacos de exendina enlazados a un vehículo, en donde el vehículo es un hidrogel. Los términos "profármaco 60 de hidrogel" y "profármaco enlazado a hidrogel" se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos enlazados transitoriamente a un hidrogel y se usan como sinónimos.

- El "hidrogel" es una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de captar grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de retículos químicos o físicos covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, entrelazamientos). Los retículos proporcionan la estructura de red e integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite hincharse en medios acuosos. Las cadenas de las redes se conectan de tal manera que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros son de dimensiones entre 1 nm y 1000 nm.
- "Forma libre" de un fármaco se refiere a un fármaco, específicamente a exendina, en su forma farmacológicamente activa, no modificada, tal como después de haber sido liberada de un conjugado polimérico. Se entiende que la forma farmacológicamente activa de la exendina también incluye el fármaco oxidado y desamidado.
- Los términos "fármaco", "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo", se usan como sinónimos y se refiere a la exendina, en su forma unida o libre.
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de exendina, según se usa en la presente memoria, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograrlo se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada fin dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que determinar una dosificación adecuada se puede lograr usando experimentación de rutina, al construir una matriz de valores y someter a prueba diferentes puntos en la matriz, todo está dentro de las habilidades normales de un médico capacitado.
- "Estable" y "estabilidad" significan que, dentro del tiempo de almacenamiento indicado, los conjugados de hidrogel permanecen conjugados y no se hidrolizan hasta una extensión sustancial y exhiben un perfil de impureza aceptable en relación con la exendina. Para considerarse estable, la composición contiene menos de 5 % del fármaco en su forma libre.
- El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora tal como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE. UU.) y/o cualquier otra agencia reguladora nacional para su uso en animales, preferiblemente, en humanos.
- "Composición farmacéutica" o "composición" significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes, así como cualquier producto que resulta, directamente o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o aglomeración de cualesquiera dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición elaborada al mezclar un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (vehículo farmacéuticamente aceptable).
- "Composición seca" significa que la composición de profármaco de hidrogel de exendina se proporciona en una forma seca en un contenedor. Los métodos adecuados para secar son secado por pulverización y liofilización (secado por congelamiento). Dicha composición seca de profármaco de hidrogel de exendina tiene un contenido de agua residual de un máximo de 10 %, preferiblemente, menos de 5 % y, más preferiblemente, menos de 2 % (determinado según Karl Fischer). El método preferido de secado es la liofilización. "Composición liofilizada" significa que la composición de profármaco polimérica de hidrogel de exendina primero se congeló y posteriormente se sometió a una reducción de agua por medio de presión reducida. Esta terminología no excluye etapas de secado adicionales que se producen en el proceso de fabricación antes de cargar la composición en el contenedor final.
- "Liofilización" (secado por congelamiento) es un proceso de deshidratación, caracterizado por congelar una composición y después reducir la presión circundante y, opcionalmente, agregar calor para permitir que el agua congelada en la composición se sublime directamente de la fase sólida a gaseosa. Típicamente, el agua sublimada se recoge mediante desublimación.
- "Reconstitución" significa la adición de un líquido a una composición seca para llevarla a la forma de una composición líquida o en suspensión. Se entiende que el término "reconstitución" no se limita a la adición de agua, sino que se refiere a la adición de cualquier líquido, incluidos, por ejemplo, tampones u otras disoluciones acuosas.
- "Disolución de reconstitución" se refiere al líquido usado para reconstituir la composición seca de un profármaco de hidrogel de exendina antes de la administración a un paciente que lo necesita.
- "Contenedor" significa cualquier contenedor en el que la composición de profármaco de hidrogel de exendina está comprendida y se puede almacenar hasta la reconstitución.
- "Tampón" o "agente tampón" se refiere a compuestos químicos que mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones tolerados fisiológicamente son, por ejemplo, fosfato de sodio, succinato, histidina, bicarbonato, citrato y acetato, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad del tampón se puede ajustar para coincidir con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

"Excipientes" se refiere a compuestos administrados junto con el agente terapéutico, por ejemplo, agentes tampón, modificadores de isotonicidad, conservantes, estabilizadores, agentes antiadsorción, agentes de protección contra oxidación u otros agentes auxiliares. Sin embargo, en algunos casos, un excipiente puede tener funciones dobles o triples.

- 5 Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras el secado en general y especialmente durante la liofilización y posterior almacenamiento. Los lioprotectores ilustrativos incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; aminoácidos tales como arginina, glicina, glutamato o histidina; metilaminas tales como betaína; sales liotrópicas tales como sulfato de magnesio; polioles tales como alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, p. ej. glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; etilenglicol; propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; almidones de hidroxialquilo, p. ej., almidón de hidroxietilo (HES, por sus siglas en inglés), y combinaciones de estos.

"Tensioactivo" se refiere a agentes humectante que bajan la tensión superficial de un líquido.

"Modificadores de la isotonicidad" se refieren a compuestos que minimizan el dolor que puede resultar del daño celular debido a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección.

- 15 El término "estabilizadores" se refiere a compuestos que se usan para estabilizar el profármaco polimérico. La estabilización se logra al fortalecer las fuerzas que estabilizan a la proteína, mediante la desestabilización del estado desnaturalizado, o mediante unión directa de excipientes a la proteína.

- 20 "Agentes antiadsorción" se refiere principalmente a tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles usados para recubrir o adsorber competitivamente en la superficie interna del contenedor de la composición. La concentración elegida y el tipo de excipiente dependen del efecto que se va a evitar, pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfaz apenas por encima del valor CMC.

"Agentes de protección contra la oxidación" se refiere a antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, glutatión, metionina, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI, por sus siglas en inglés), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico.

- 25 "Antimicrobiana" se refiere a una sustancia química que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras, protozoarios y/o destruye virus.

"Sellar un contenedor" significa que el contenedor se cierra de tal manera que es estanco al aire, no permite el intercambio gaseoso entre el exterior y el interior y mantiene el contenido estéril.

- 30 El término "reactivo" o "precursor" se refiere a un intermediario o material de partida usado en el proceso de ensamblaje que conduce a un profármaco de la presente invención.

- 35 El término "grupo químico funcional" se refiere a ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol y derivados, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácido fosfónico y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, acrililo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes arilantes como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, oxirano y aziridina.

Si un grupo químico funcional se acopla a otro grupo químico funcional, la estructura química resultante se denomina un "enlace". Por ejemplo, la reacción de un grupo amina con un grupo carboxilo resulta en un enlace amida.

- 40 "Grupos reactivos funcionales" son grupos químicos funcionales del resto de cadena principal que están conectados al resto hiperramificado.

"Grupo funcional" es el término colectivo usado para un "grupo reactivo funcional", "grupo degradable interconectado funcional" o "grupo conjugado funcional".

- 45 Un "grupo degradable interconectado funcional" es un enlace que comprende una unión biodegradable que por un lado se conecta con un resto espaciador conectado a un resto de cadena principal y por el otro lado se conecta al resto reticulador. Los términos "grupo degradable interconectado funcional", "grupo biodegradable interconectado funcional", "grupo interconectado biodegradable funcional" y "grupo interconectado funcional" se usan como sinónimos.

- 50 Los términos "grupo de bloqueo" o "grupo de terminación de cadena" se usan como sinónimos y hacen referencia a restos que se conectan de manera irreversible a grupos reactivos funcionales para volverlos incapaces de hacer reacción con, por ejemplo, grupos químicos funcionales.

Los términos "grupo que protege" o "grupo protector" se refiere a un resto que se conecta de manera reversible a grupos reactivos funcionales para volverlos incapaces de hacer reacción con, por ejemplo, otros grupos químicos funcionales.

5 El término "grupo interconectable funcional" se refiere a grupos químicos funcionales que participan en una reacción de polimerización radical y son parte del reactivo reticulador o el reactivo de cadena principal.

El término "grupo polimerizable funcional" se refiere a grupos químicos funcionales que participan en una reacción de polimerización de tipo ligadura y son parte del reactivo reticulador y el reactivo de cadena principal.

Un resto de cadena principal puede comprender un resto espaciador que en un extremo se conecta al resto de cadena principal y en el otro lado al resto reticulador.

10 El término "derivados" se refiere a grupos químicos funcionales sustituidos de manera adecuada con grupos protectores y/o de activación o a formas activadas de un grupo químico funcional correspondiente que son conocidas para el experto en la técnica. Por ejemplo, las formas activadas de grupos carboxilo incluyen, pero no se limitan a, ésteres activos, tales como éster de succinimidilo, éster de benzotriacilo, éster de nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de azabenzotriacilo, halogenuros de acilo, anhídridos mixtos o simétricos, imidazol de acilo.

15 El término "enlazador escindible no enzimáticamente" se refiere a enlazadores que son hidrolíticamente degradables en condiciones fisiológicas sin actividad enzimática.

"Enlazador no biológicamente activo" significa un enlazador que no exhibe los efectos farmacológicos del fármaco derivado del resto biológicamente activo.

20 Los términos "espaciador", "grupo espaciador", "molécula espaciadora" y "resto espaciador" se usan de manera intercambiable y si se usan para describir un resto presente en el vehículo de hidrogel de la invención, hacen referencia a cualquier resto adecuado para conectar dos restos, tales como alquilo C₁₋₅₀, alqueno C₂₋₅₀ o alquino C₂₋₅₀, cuyo fragmento se interrumpe opcionalmente mediante uno o más grupos seleccionados de -NH-, -N(alquilo C₁₋₄)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)N(alquilo C₁₋₄)-, -O-C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, heterociclo de 4 a 7 miembros, fenilo o naftilo.

25 Los términos "terminal", "extremo" o "extremo distal" hacen referencia a la posición de un grupo funcional o enlace dentro de una molécula o resto, por el cual dicho grupo funcional puede ser un grupo químico funcional y el enlace puede ser un enlace degradable o permanente, caracterizado por estar ubicado adyacente o dentro de un enlace entre dos restos o en el extremo de una cadena oligomérica o polimérica.

30 Las frases "en forma unida" o "resto" hacen referencia a subestructuras que son parte de una molécula más grande. La frase "en forma unida" se usa para simplificar la referencia a restos al nombrar o indicar reactivos, materiales de partida o materiales de partida hipotéticos conocidos en la técnica y, por los cuales, "en forma unida" significa que, por ejemplo, uno o más radicales hidrógeno (-H), u uno o más grupos activadores o protectores presentes en los reactivos o materiales de partida no están presentes en el resto.

35 Se entiende que todos los reactivos y restos que comprenden restos poliméricos hacen referencia a entidades macromoleculares conocidas por exhibir variabilidades con respecto al peso molecular, longitud de cadena o grado de polimerización, o la cantidad de grupos funcionales. Las estructuras que se muestran para los reactivos de cadena principal, restos de cadena principal, reactivos reticuladores y restos reticuladores, son, por lo tanto, solo ejemplos representativos.

40 Un reactivo o resto puede ser lineal o ramificado. Si el reactivo o resto tiene dos grupos terminales, se denomina reactivo o resto lineal. Si el reactivo o resto tiene más de dos grupos terminales, se considera que es un reactivo o resto ramificado o multifuncional.

El término "cadena polimérica basada en poli(etilenglicol)" o "cadena basada en PEG" se refiere a una cadena molecular oligo o polimérica.

45 Preferiblemente, dicha cadena polimérica basada en poli(etilenglicol) se conecta a un núcleo ramificante, es una cadena de poli(etilenglicol) lineal, de la cual un extremo está conectado al núcleo ramificante y el otro a un resto dendrítico hiperramificado. Se entiende que una cadena basada en PEG se puede terminar o interrumpir mediante grupos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos químicos funcionales.

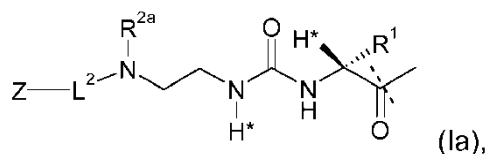
Si el término "cadena polimérica basada en poli(etilenglicol)" se usa en referencia a un reactivo reticulador, se refiere a un resto o cadena reticuladora que comprende al menos 20 % en peso de restos etilenglicol.

50 En las siguientes secciones la invención se describe en mayor detalle.

La presente invención se refiere a un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable de este que comprende un conjugado de exendina enlazador D-L, en donde

D representa un resto exendina; y

-L es un resto enlazador no biológicamente activo -L¹ se representa mediante la fórmula (la),



5 en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

R₁ es CH₃,

R^{2a} se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄;

L² es una unión química simple o un espaciador; y

Z es un hidrogel.

10 en donde el hidrogel es una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de captar grandes cantidades de agua, compuesta por homopolímeros o copolímeros, que son insolubles debido a la presencia de retículos químicos o físicos covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, entrelazamientos);

15 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida.

Preferiblemente, L¹ no se sustituye adicionalmente.

20 Preferiblemente, el resto de exendina se acopla a L¹ a través del nitrógeno en el extremo N o a través de un nitrógeno de una cadena lateral de lisina del resto de exendina. Lo más preferiblemente, el resto de exendina se acopla a L¹ a través del nitrógeno en el extremo N.

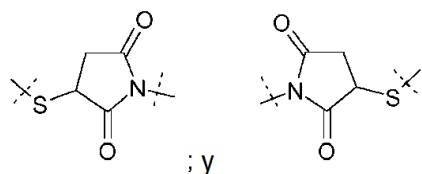
El término "interrumpido" significa que entre dos carbonos se inserta un grupo o en el extremo de la cadena de carbono entre el carbono e hidrógeno.

L² es una unión química simple o un espaciador. En el caso de que L² sea un espaciador, se define preferiblemente como el uno o más sustituyentes opcionales definidos anteriormente, siempre que L² se sustituya con Z.

25 Más preferiblemente, L² es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que se interrumpe opcionalmente mediante uno o más grupos seleccionados independientemente de -O-; y C(O)N(R^{3aa}); opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de OH; y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}); y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄.

Preferiblemente, L² tiene un peso molecular en el intervalo de 14 g/mol a 750 g/mol.

30 Preferiblemente, L² se acopla a Z a través de un grupo terminal seleccionado de



En el caso de que L² tenga dicho grupo terminal, se prefiere adicionalmente que L² tenga un peso molecular en el intervalo de 14 g/mol a 500 g/mol calculado sin dicho grupo terminal.

Preferiblemente, el acoplamiento covalente formado entre el enlazador y Z es una unión permanente.

35 Preferiblemente, el hidrogel Z es un hidrogel insoluble en agua basado en poli(etilenglicol) (PEG) biodegradable. El término "basado en PEG" según se entiende en la presente memoria significa que la proporción en masa de cadenas de PEG en el hidrogel es al menos 10 % en peso, preferiblemente al menos 25 %, en base al peso total del hidrogel. El resto puede estar compuesto por otros espaciadores y/u oligómeros o polímeros, tales como oligo o polilisinas.

Además, el término "insoluble en agua" se refiere a una red molecular hinchable tridimensionalmente reticulada que forma el hidrogel. El hidrogel si se suspende en un gran exceso de agua o tampón acuoso de osmolalidad fisiológica puede captar una cantidad sustancial de agua, p. ej., hasta 10 veces en base a un peso en peso y, por lo tanto, es hinchable, pero después de retirar el exceso de agua todavía conserva la estabilidad física de un gel y una forma.

5 Dicha forma puede ser de cualquier geometría y se entiende que dicho objeto de hidrogel individual se debe considerar como una molécula simple que consiste en componentes en donde cada componente se conecta con otro componente a través de uniones químicas.

Según la presente invención, el hidrogel puede estar compuesto por restos de cadena principal interconectados mediante uniones hidrolíticamente degradables. Preferiblemente, el hidrogel es un hidrogel basado en PEG que comprende restos de cadena principal.

Preferiblemente, L^2 está conectado a un resto de cadena principal.

Preferiblemente, el resto de cadena principal tiene un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente, de 1 kDa a 15 kDa e, incluso más preferiblemente, de 1 kDa a 10 kDa. Los restos de cadena principal también se basan preferiblemente en PEG y comprenden una o más cadenas de PEG.

15 En un hidrogel que lleva conjugados de exendina-enlazador según la invención, un resto de cadena principal se caracteriza por una cantidad de grupos funcionales, que comprenden grupos interconectados biodegradables funcionales y conjugados de fármaco-enlazador conectados al hidrogel, y opcionalmente grupos de terminación de la cadena. Esto significa que un resto de cadena principal se caracteriza por una cantidad de conjugados de fármaco-enlazador conectados al hidrogel; grupos funcionales, que comprenden grupos biodegradables

20 interconectados funcionales; y opcionalmente grupos de terminación de la cadena. Preferiblemente, la suma de grupos interconectados biodegradables funcionales y conjugados de fármaco-enlazador y grupos de terminación de cadena es 16-128, preferiblemente, 20-100, más preferiblemente, 24-80, y lo más preferiblemente, 30-60.

Preferiblemente, la suma de grupos interconectados funcionales y conjugados de fármaco-enlazador conectados al hidrogel y grupos de terminación de cadena de un resto de cadena principal se divide de manera igual entre la cantidad de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo ramificante. Por ejemplo, si hay 32 grupos interconectados funcionales y conjugados de fármaco-enlazador conectados al hidrogel y grupos de terminación de cadena, se pueden proporcionar ocho grupos en cada una de las cuatro cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, preferiblemente, por medio de restos dendríticos acoplados a un extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, se pueden proporcionar cuatro grupos en cada una de las ocho cadenas poliméricas basadas en PEG que se extiende desde el núcleo o dos grupos en cada una de las dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG. Si la cantidad de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo ramificante no permite una distribución igual, se prefiere que la desviación de la cantidad media de la suma de grupos interconectados funcionales y conjugados de fármaco-enlazador conectados al hidrogel y grupos de terminación de cadena por cadena polimérica basada en PEG se mantenga en un mínimo.

35 En dichos profármacos de vehículo-enlazador según la invención, es deseable que casi toda la liberación del fármaco (>90 %) se haya producido antes de que se produzca una liberación de una cantidad significativa de los restos de cadena principal (<10 %). Esto se puede lograr al ajustar la semivida del profármaco de vehículo-enlazador con respecto a la cinética de degradación del hidrogel según la invención.

Preferiblemente, un resto de cadena principal se caracteriza por tener un núcleo ramificante, a partir del cual se extienden al menos tres cadenas poliméricas basadas en PEG. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la presente invención, el reactivo de cadena principal comprende un núcleo ramificante, a partir del cual se extienden al menos tres cadenas poliméricas basadas en PEG. Dichos núcleos ramificantes pueden estar comprendidos por poli u oligoalcoholes en forma unida, preferiblemente, pentaeritritol, tripentaeritritol, hexaglicerina, sacarosa, sorbitol, fructosa, manitol, glucosa, celulosa, amilosas, almidones, almidones de hidroxialquilo, polivinilalcoholes, dextranos, hialuronanos, o los núcleos ramificantes pueden estar comprendidos por poli u oligoaminas tales como ornitina, ácido diaminobutírico, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina u oligolisinas, polietileniminas, polivinilaminas en forma unida.

Preferiblemente, el núcleo ramificante extiende tres a dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG, más preferiblemente, cuatro a ocho. Los núcleos ramificantes preferidos pueden comprender pentaeritritol, ornitina, ácido diaminobutírico, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina u oligolisina, PEI de bajo peso molecular, hexaglicerina, tripentaeritritol en forma unida. Preferiblemente, el núcleo ramificante extiende tres a dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG, más preferiblemente, cuatro a ocho. Preferiblemente, una cadena polimérica basada en PEG es una cadena de poli(etilenglicol) lineal, de la cual un extremo está conectado al núcleo ramificante y el otro a un resto dendrítico hiperramificado. Se entiende que una cadena basada en PEG polimérica se puede terminar o interrumpir mediante grupos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos químicos funcionales.

Preferiblemente, una cadena polimérica basada en PEG es un derivado de poli(etilenglicol) sustituido de manera adecuada.

Las estructuras preferidas para cadenas poliméricas basadas en PEG correspondientes que se extienden desde un núcleo ramificante contenido en un resto de cadena principal son derivados de PEG con múltiples brazos como, por ejemplo, se detalla en la lista de productos de JenKem Technology, EE. UU. (accedida por descarga desde www.jenkemusa.com el 28 de julio de 2009), derivados de PEG de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol), derivados de PEG de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina) y derivados de PEG de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol). Los más preferidos son PEG Amina de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol) y PEG Carboxilo de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol), PEG Amina de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina), PEG Carboxilo de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina), PEG Amina de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol) y PEG Carboxilo de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol). Los pesos moleculares preferidos para dichos derivados de PEG de múltiples brazos en un resto de cadena principal son 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente, 1 kDa a 15 kDa e, incluso más preferiblemente, 1 kDa a 10 kDa.

Se entiende que los grupos amina terminales de las moléculas de múltiples brazos mencionadas anteriormente están presentes en forma unida en el resto de cadena principal para proporcionar grupos interconectados funcionales y grupos reactivos funcionales adicionales de un resto de cadena principal.

Se prefiere que la suma de grupos interconectados funcionales y grupos reactivos funcionales de un resto de cadena principal se divida de manera igual entre la cantidad de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo ramificante. Si la cantidad de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo ramificante no permite una distribución igual, se prefiere que la desviación de la cantidad media de la suma de grupos interconectados y reactivos funcionales por cadena polimérica basada en PEG se mantenga en un mínimo.

Más preferiblemente, la suma de grupos interconectados y reactivos funcionales de un resto de cadena principal se divide de manera igual entre la cantidad de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo ramificante. Por ejemplo, si hay 32 grupos interconectados funcionales y grupos reactivos funcionales, se pueden proporcionar ocho grupos en cada una de las cuatro cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, preferiblemente, por medio de restos dendríticos acoplados a un extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, se pueden proporcionar cuatro grupos en cada una de las ocho cadenas poliméricas basadas en PEG que se extiende desde el núcleo o dos grupos en cada una de las dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG.

Dichos grupos funcionales adicionales se pueden proporcionar mediante restos dendríticos. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa, más preferiblemente, de 0,4 kDa a 2 kDa. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene al menos 3 ramificaciones y al menos 4 grupos reactivos funcionales, y como máximo 63 ramificaciones y 64 grupos reactivos funcionales, se prefieren al menos 7 ramificaciones y al menos 8 grupos reactivos funcionales y como máximo 31 ramificaciones y 32 grupos reactivos funcionales. Los ejemplos de dichos restos dendríticos están comprendidos por trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina, hexadecalisina, heptadecalisina, octadecalisina, nonadecalisina en forma unida. Los ejemplos de dichos restos dendríticos preferidos están comprendidos por trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, en forma unida, los más preferidos son trilisina, pentalisina o heptalisina, ornitina, ácido diaminobutírico en forma unida.

Lo más preferiblemente, el vehículo de hidrogel de la presente invención se caracteriza porque el restos de cadena principal tiene un carbono cuaternario de fórmula $C(A-Hyp)_4$, en donde cada A es independientemente una cadena polimérica basada en poli(etilenglicol) acoplada terminalmente al carbono cuaternario mediante una unión covalente permanente y el extremo distal de la cadena polimérica basada en PEG se une covalentemente a un resto dendrítico Hyp, cada resto dendrítico Hyp tiene al menos cuatro grupos funcionales que representan los grupos interconectados funcionales y los grupos reactivos funcionales.

Preferiblemente, cada A se selecciona independientemente de la fórmula $-(CH_2)_{n1}(OCH_2CH_2)_nX-$, en donde $n1$ es 1 o 2; n es un número entero en el intervalo de 5 a 50; y X es un grupo químico funcional que enlaza covalentemente A e Hyp.

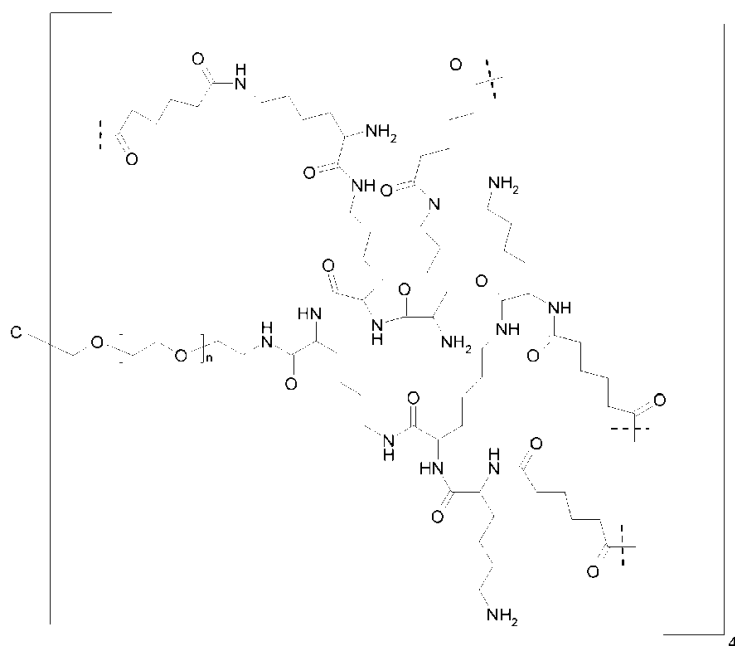
Preferiblemente, A y Hyp están covalentemente enlazados mediante un enlace amida.

Preferiblemente, el resto dendrítico Hyp es un polipéptido hiperramificado. Preferiblemente, el polipéptido hiperramificado comprende lisina en forma unida. Preferiblemente, cada resto dendrítico Hyp tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa. Se entiende que un resto de cadena principal $C(A-Hyp)_4$ puede consistir en los mismos restos dendríticos Hyp o diferentes y que cada Hyp se puede elegir independientemente. Cada resto Hyp consiste en entre 5 y 32 lisinas, preferiblemente, al menos 7 lisinas, es decir, cada resta Hyp está comprendido por entre 5 y 32 lisinas en forma unida, preferiblemente, al menos 7 lisinas en forma unida. Lo más preferiblemente, Hyp está comprendido por heptalisinilo.

La reacción de grupos polimerizables funcionales de un reactivo de cadena principal, más específicamente de Hyp con los grupos polimerizables funcionales de reactivos reticuladores basados en poli(etilenglicol) resulta en una unión amida permanente.

5 Preferiblemente, C(A-Hyp)₄ tiene un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente, 1 kDa a 15 kDa e incluso más preferiblemente 1 kDa a 10 kDa.

Un resto de cadena principal preferido se muestra a continuación, las líneas punteadas indican enlaces de interconexión biodegradables con restos reticuladores y n es número entero de 5 a 50:



10 La biodegradabilidad de los hidrogeles según la presente invención se logra mediante la introducción de uniones hidrolíticamente degradables.

15 Los términos "hidrolíticamente degradable", "biodegradable" o "hidrolíticamente escindible", "autoescindible" o "autoescisión", "autoescindible", "transitorio" o "temporal" hacen referencia, dentro del contexto de la presente invención, a uniones y enlaces que son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables o escindibles en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas que varían de una hora a tres meses, que incluyen, pero no se limitan a, aconitilos, acetales, amidas, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas de ácido maleámico, orto ésteres, fosfamidas, fosfoésteres, ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de estos y similares.

20 Si está presente en un hidrogel según la invención como un grupo degradable interconectado funcional, los enlaces biodegradables preferidos son ésteres carboxílicos, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácido sulfónico y los más preferidos son ésteres carboxílicos o carbonatos.

Los enlaces permanentes son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas de seis meses o más, tales como, por ejemplo, amidas.

Para introducir las uniones hidrolíticamente escindibles en el vehículo de hidrogel de la invención, los restos de cadena principal se pueden enlazar directamente entre sí por medio de uniones biodegradables.

25 En una realización, los restos de cadena principal del vehículo de hidrogel biodegradable se pueden enlazar directamente entre sí, es decir, sin restos reticuladores. Los restos dendríticos hiperramificados de dos restos de cadena principal de dicho hidrogel biodegradable se pueden enlazar directamente a través de un grupo interconectado funcional que conecta los dos restos dendríticos hiperramificados. Alternativamente, dos restos dendríticos hiperramificados de dos restos de cadena principal diferentes se pueden interconectar a través de dos restos espaciadores conectados a un resto de cadena principal y en el otro lado conectados a un resto reticulador separado por grupos interconectados funcionales.

30 Alternativamente, los restos de cadena principal se pueden enlazar entre sí a través de restos reticuladores, cada resto reticulador está terminado por al menos dos de las uniones hidrolíticamente degradables. Además de las uniones de terminación degradables, los restos reticuladores pueden contener uniones biodegradables adicionales.

35 Por lo tanto, cada extremo del resto reticulador enlazado a un resto de cadena principal comprende una unión

hidrolíticamente degradable, y uniones biodegradables adicionales pueden estar opcionalmente presentes en el resto reticulador.

5 Preferiblemente, el vehículo de hidrogel biodegradable está compuesto por restos de cadena principal interconectados mediante uniones hidrolíticamente degradables y los restos de cadena principal están enlazados entre sí a través de restos reticuladores.

El vehículo de hidrogel biodegradable puede contener uno o más tipos diferentes de restos reticuladores, preferiblemente uno. El resto reticulador puede ser una molécula lineal o ramificada y, preferiblemente, es una molécula lineal. En una realización preferida de la invención, el resto reticulador se conecta a restos de cadena principal mediante al menos dos uniones biodegradables.

10 Preferiblemente, los restos reticuladores tienen un peso molecular en el intervalo de 60 Da a 5 kDa, más preferiblemente, de 0,5 kDa a 5 kDa, incluso más preferiblemente de 1 kDa a 4 kDa e, incluso más preferiblemente, de 1 kDa a 3 kDa. En una realización, un resto reticulador consiste en un polímero.

15 Además de restos reticuladores oligoméricos o poliméricos, se pueden usar restos reticuladores de bajo peso molecular, especialmente cuando se usan restos de cadena principal hidrófilos de alto peso molecular para la formación de un hidrogel biodegradable según la invención.

20 Preferiblemente, los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) son cadenas de hidrocarburo que comprenden unidades de etilenglicol, opcionalmente comprenden, además, grupos químicos funcionales, en donde los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) comprende al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en donde m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente, de 10 a 70. Preferiblemente, los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.

Si se usa en referencia a un resto reticulador o una cadena polimérica basada en PEG conectada a un núcleo ramificante, el término "basado/a en PEG" hace referencia a un resto reticulador o cadena polimérica basada en PEG que comprende al menos 20 % en peso de restos etilenglicol.

25 En una realización, los monómeros que constituyen los restos reticuladores poliméricos están conectados mediante uniones biodegradables. Dichos restos reticuladores poliméricos pueden contener hasta 100 uniones biodegradable o más, dependiendo del peso molecular del resto reticulador y el peso molecular de las unidades monoméricas. Los ejemplos de dichos restos reticuladores son polímeros basados en poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico). Se entiende que dicha cadena de poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico) se puede terminar o interrumpir mediante grupos alquilo o arilo y que opcionalmente se pueden sustituir con heteroátomos y grupos químicos funcionales.

30 Preferiblemente, los restos reticuladores son basados en PEG, preferiblemente, representados mediante solo una cadena molecular basada en PEG. Preferiblemente, los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) son cadenas de hidrocarburo que comprenden unidades de etilenglicol, opcionalmente comprenden, además, grupos químicos funcionales, en donde los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) comprende al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en donde m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente, de 10 a 70.

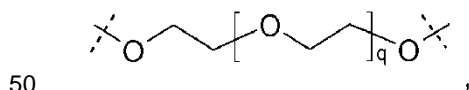
35 Preferiblemente, los restos reticuladores basados en poli(etilenglicol) tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.

En una realización preferida de la presente invención, el resto reticulador consiste en PEG, que está simétricamente conectado a través de uniones éster a dos espaciadores dicarboxílicos alfa, omega-alifáticos proporcionados por restos de cadena principal conectados al resto dendrítico hiperramificado a través de uniones amida permanentes.

40 Los ácidos dicarboxílicos de los restos espaciadores conectados a un resto de cadena principal y en el otro lado están conectados a un resto reticulador que consiste en 3 a 12 átomos de carbono, lo más preferiblemente, entre 5 y 8 átomos de carbono y se pueden sustituir en uno o más átomo de carbono. Los sustituyentes preferidos son grupos alquilo, grupos hidroxilo o grupos amido o grupos amino sustituidos. Uno o más de los grupos metileno del ácido dicarboxílico alifático se pueden sustituir opcionalmente por O o NH o N con alquilo sustituido. El alquilo preferido es alquilo lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de carbono.

45 Preferiblemente, hay una unión amida permanente entre el resto dendrítico hiperramificado y el resto espaciador conectado a un resto de cadena principal y por el otro lado está conectado a un resto reticulador.

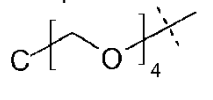
Un resto reticulador preferido se muestra a continuación; las líneas punteadas indican enlaces de interconexión biodegradables con restos de cadena principal:



en donde q es un número entero de 5 a 50.

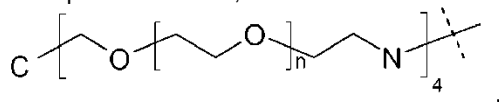
Preferiblemente, el vehículo de hidrogel está compuesto por restos de cadena principal interconectados mediante uniones hidrolíticamente degradables.

Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden un núcleo ramificante de la siguiente fórmula:



5 en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante del resto de cadena principal.

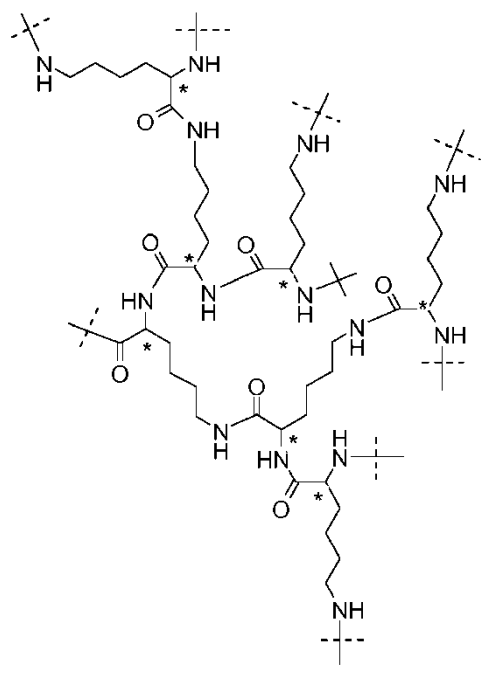
Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden una estructura con la siguiente fórmula:



en donde n es un número entero de 5 a 50 y la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante del resto de cadena principal.

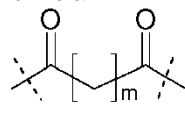
10 Preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp.

Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden un resto hiperramificado Hyp con la siguiente fórmula:



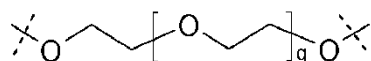
15 en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

Preferiblemente, los restos de cadena principal están acoplados con al menos un espaciador con la siguiente fórmula:



20 en donde una de las líneas punteadas indica el acoplamiento con el resto hiperramificado Hyp y la segunda línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula; y en donde m es un número entero de 2 a 4.

Preferiblemente, los restos de cadena principal están enlazados entre sí a través de restos reticuladores que tienen la siguiente estructura



en donde

q es un número entero de 3 a 100, preferiblemente de 5 a 50.

5 En profármacos de hidrogel de la invención, la tasa de hidrólisis de las uniones biodegradables entre restos de cadena principal y restos reticuladores se afecta o determina por la cantidad y tipo de átomos adyacentes conectados al grupo de carboxi éster de PEG. Por ejemplo, al seleccionar de ácido succínico, adipico o glutárico para la formación del éster de PEG se pueden variar las semividas de degradación del vehículo de hidrogel biodegradable según la invención.

10 Preferiblemente, L^2 se acopla a Z a través de un grupo tiosuccinimida que a su vez se acopla al resto de cadena principal del hidrogel a través de un espaciador, que es una cadena de oligoetilenglicol. Preferiblemente, el enlace de esta cadena espaciadora al resto de cadena principal es una unión permanente, preferiblemente una unión amida.

La biodegradabilidad de los hidrogeles según la presente invención se logra mediante la introducción de uniones hidrolíticamente degradables.

15 Para los grupos interconectados funcionales, el término "hidrolíticamente degradable" hace referencia, dentro del contexto de la presente invención, a enlaces que son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas que varían de una hora a tres meses, que incluyen, pero no se limitan a, aconitilos, acetales, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas de ácido maleámico, orto ésteres, fosfamidas, fosfoésteres, ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de estos y similares. Los enlaces biodegradables preferidos son ésteres
20 carboxílicos, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácido sulfónico y los más preferidos son ésteres carboxílicos o carbonatos. Se entiende que para estudios in vitro se pueden usar condiciones aceleradas como, por ejemplo, pH 9, 37 °C, tampón acuoso, con fines prácticos.

Los enlaces permanentes son no enzimáticamente hidrolíticamente degradables en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas de seis meses o más, tales como, por ejemplo, amidas.

25 La degradación del vehículo de hidrogel biodegradable según la invención es una reacción de múltiples etapas donde una multitud de uniones degradables se escinden y resultan en productos de degradación que pueden ser solubles en agua o insolubles en agua. Sin embargo, los productos de degradación insolubles en agua pueden comprender, además, uniones degradables de manera que se puedan escindir y se obtienen dichos productos de degradación solubles en agua. Estos productos de degradación solubles en agua pueden comprender uno o más
30 restos de cadena principal. Se entiende que los restos de cadena principal liberados, por ejemplo, se pueden conjugar permanentemente con grupos espaciadores o bloqueadores o enlazadores o grupos de afinidad y/o productos de degradación de enlazador de profármaco y que los productos de degradación solubles en agua también pueden comprender uniones degradables.

35 Las estructuras del núcleo ramificante, cadenas poliméricas basadas en PEG, restos dendríticos hiperramificados y restos acoplados a los restos dendríticos hiperramificados se pueden inferir a partir de las descripciones correspondientes proporcionadas en las secciones que abarcan los vehículos de hidrogel de la presente invención. Se entiende que la estructura de un degradante depende del tipo de hidrogel según la invención que sufre la degradación.

40 La cantidad total de restos de cadena principal se puede medir en disolución después de la degradación completa del hidrogel según la invención, y durante la degradación se pueden separar fracciones de productos de degradación de la cadena principal solubles del hidrogel insoluble según la invención y se pueden cuantificar sin interferencia de otros productos de degradación solubles liberados a partir del hidrogel según la invención. Un hidrogel objeto según la invención se puede separar del exceso de agua del tampón de osmolalidad fisiológica mediante sedimentación o centrifugación. Se puede llevar a cabo centrifugación de tal manera que el sobrenadante
45 proporcione al menos 10 % del volumen del hidrogel hinchado según la invención. Los productos de degradación del hidrogel solubles permanecen en el sobrenadante acuoso después de dicha etapa de sedimentación o centrifugación, y los productos de degradación solubles en agua que comprenden uno o más restos de cadena principal se pueden detectar al someter alícuotas de dicho sobrenadante a métodos de separación y/o análisis adecuados.

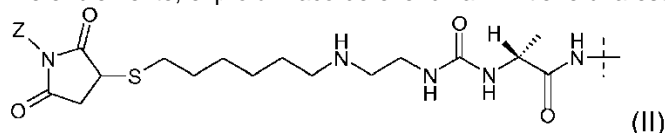
50 Preferiblemente, los productos de degradación solubles en agua se pueden separar de los productos de degradación insolubles en agua mediante filtración a través de filtros de 0,45 μm , a continuación, los productos de degradación solubles en agua se pueden encontrar en el flujo continuo. Los productos de degradación solubles en agua también se pueden separar de los productos de degradación insolubles en agua mediante una combinación de una etapa de centrifugación y una de filtración.

55 Por ejemplo, los restos de cadena principal pueden llevar grupos que exhiben absorción UV en longitud de onda donde otros productos de degradación no exhiben absorción UV. Dichos grupos que absorben UV selectivamente pueden ser componentes estructurales del resto de cadena principal tales como uniones amida o se pueden

introducir en la cadena principal mediante acoplamiento a sus grupos reactivos funcionales por medio de sistemas de anillo aromáticos tales como grupos indoilo.

- 5 En dichos profármacos de exendina enlazados a hidrogel según la invención, es deseable que casi toda la liberación de la exendina (>90 %) se haya producido antes de que se produzca una liberación de una cantidad significativa de los productos de degradación de cadena principal (<10 %). Esto se puede lograr al ajustar la semivida del profármaco de exendina enlazado a hidrogel con respecto a la cinética de degradación del hidrogel.

Preferiblemente, el profármaco de exendina D-L tiene una estructura, donde L se representa mediante la fórmula (II)

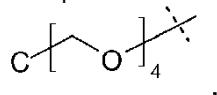


- 10 en donde la línea punteada indica el acoplamiento a un nitrógeno, preferiblemente el nitrógeno del extremo N, de la exendina al formar una unión amida y Z es un hidrogel;

Preferiblemente, el hidrogel en la fórmula (II) es un hidrogel insoluble en agua basado en poli(etilenglicol) (PEG) biodegradable.

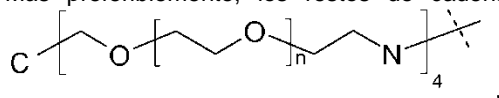
Preferiblemente, el hidrogel en la fórmula (II) está compuesto por restos de cadena principal interconectados mediante uniones hidrolíticamente degradables.

- 15 Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden un núcleo ramificante de la siguiente fórmula:



en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante del resto de cadena principal.

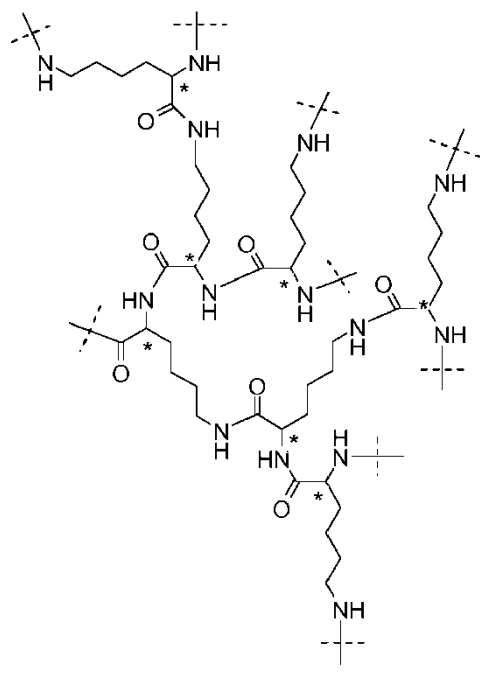
Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden una estructura con la siguiente fórmula:



- 20 en donde n es un número entero de 5 a 50 y la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula.

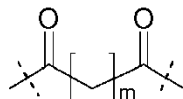
Preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp.

Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden un resto hiperramificado Hyp con la siguiente fórmula:



en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

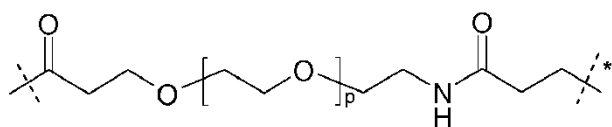
Preferiblemente, los restos de cadena principal están acoplados con al menos un espaciador con la siguiente fórmula:



5 ,

en donde una de las líneas punteadas indica el acoplamiento con el resto hiperramificado Hyp y la segunda línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula; y en donde m es un número entero de 2 a 4.

Preferiblemente, los restos de cadena principal están acoplados con al menos un espaciador con la siguiente fórmula:



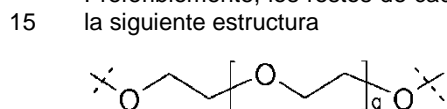
10 ,

en donde la línea punteada marcada con el asterisco indica la unión entre el hidrogel y el N del grupo tiosuccinimida;

en donde la otra línea punteada indica el acoplamiento con Hyp; y

en donde p es un número entero de 0 a 10.

Preferiblemente, los restos de cadena principal están enlazados entre sí a través de restos reticuladores que tienen la siguiente estructura



15 en donde q es un número entero de 3 a 100.

La tasa de hidrólisis de las uniones biodegradables entre restos de cadena principal y restos reticuladores se determina por la cantidad y tipo de átomos adyacentes conectados al grupo de carboxi éster de PEG. Por ejemplo, al seleccionar de ácido succínico, adípico o glutárico para la formación del éster de PEG se pueden variar las semividas de degradación del reticulador.

20

El profármaco de exendina enlazado a hidrogel de la presente invención se puede preparar a partir del hidrogel de la presente invención mediante métodos convenientes conocidos en la técnica. Está claro para un experto en la técnica que existen diversas vías. Por ejemplo, el enlazador de profármaco mencionado anteriormente al cual se acopla el resto biológicamente activo covalentemente se puede hacer reaccionar con los grupos reactivos funcionales del hidrogel de la presente invención con o con ya llevar el resto activo en parte o entero.

25

En un método de preparación preferido, el hidrogel se genera a través de reacciones de ligadura química. El hidrogel se puede formar a partir de dos eductos macromoleculares con funcionalidades complementarias que sufren una reacción tal como una condensación o adición. Uno de estos materiales de partida es un reactivo reticulador con al menos dos grupos funcionales idénticos y el otro material de partida es un reactivo de cadena principal homomultifuncional. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo reticulador incluyen amino terminal, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta insaturados como grupos vinilsulfona, tiol, hidroxilo. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo de cadena principal incluyen, pero no se limitan a, amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta insaturados como grupos vinilsulfona, tiol, hidroxilo.

30
35

Si los grupos reticuladores reactivos funcionales reactivos se usan subestequiométricamente con respecto a los grupos de cadena principal reactivos funcionales, el hidrogel resultante será un hidrogel reactivo con grupos reactivos funcionales libres acoplados a la estructura de cadena principal.

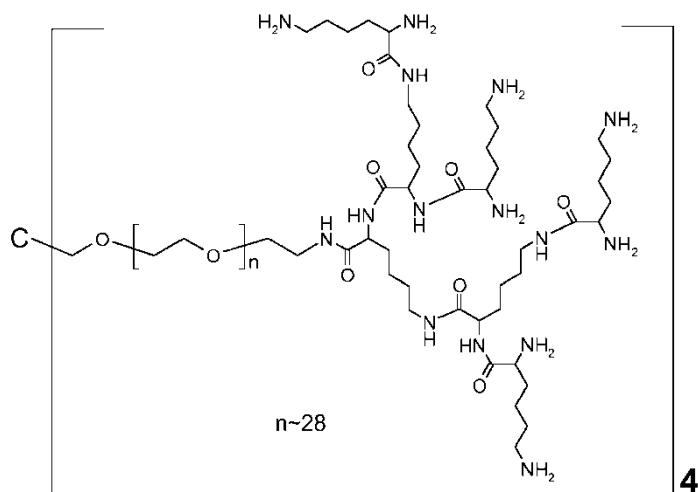
Opcionalmente, el enlazador de profármaco se puede conjugar primero con exendina y el conjugado de exendina-enlazador de profármaco resultante después se puede hacer reaccionar con los grupos reactivos funcionales del hidrogel. Alternativamente, después de la activación de uno de los grupos funcionales del enlazador de profármaco, el conjugado de enlazador-hidrogel se puede poner en contacto con exendina en la segunda etapa de reacción y el exceso de exendina se puede retirar por filtración después de la conjugación de la exendina con el enlazador de profármaco unido a hidrogel.

40

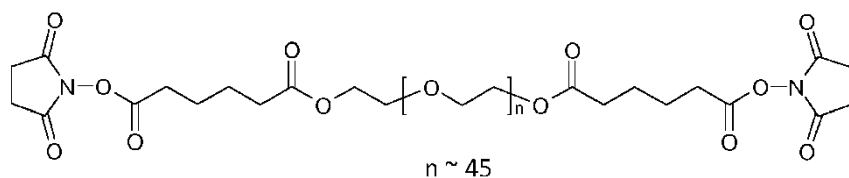
Un proceso preferido para la preparación de un profármaco según la presente invención es el siguiente:

Un material de partida preferido para la síntesis del reactivo de cadena principal es un PEG tetra amina de 4 brazos o PEG octa amina de 8 brazos, donde el reactivo PEG tiene un peso molecular que varía de 2000 a 10000 Dalton, lo más preferiblemente, de 2000 a 5000 Da. A dichos derivados de PEG con múltiples brazos se acoplan secuencialmente residuos lisina para formar el reactivo de cadena principal hiperramificado. Se entiende que las lisinas pueden estar parcialmente o completamente protegidas mediante grupos protectores durante las etapas de acoplamiento y que también el reactivo de cadena principal final puede contener grupos protectores. Un componente básico preferido es bis-boc lisina. Alternativamente, en lugar de adiciones secuenciales de residuos lisina, se puede ensamblar un resto de poli-lisina dendrítico primero y posteriormente acoplarlo al PEG tetra amina de 4 brazos o el PEG octa amina de 8 brazos. Es deseable obtener el reactivo de cadena principal que lleve 32 grupos amino, en consecuencia, siete lisinas se acoplarían a cada brazo de un PEG de 4 brazos, o cinco lisinas se acoplarían a cada brazo de un PEG de 8 brazos. En otra realización, el derivado de PEG de múltiples brazos es un PEG tetra u octa carboxi. En este caso, los restos dendríticos se pueden generar a partir de ácido glutámico o aspártico, y el reactivo de cadena principal resultante llevaría 32 grupos carboxi. Se entiende que todos o una fracción de los grupos funcionales del reactivo de cadena principal pueden estar presentes en forma libre, como sales o conjugados con grupos protectores. Se entenderá que por motivos prácticos la cantidad de lisinas del reactivo de cadena principal por brazo de PEG será entre seis y siete, más preferiblemente, aproximadamente siete.

Un reactivo de cadena principal preferido se muestra a continuación:



La síntesis del reactivo reticulador comienza a partir de una cadena PEG lineal con un peso molecular que varía de 0,2 a 5 kDa, más preferiblemente, de 0,6 a 2 kDa, que está esterificado con medio éster de un ácido dicarboxílico, tal como ácido adípico o ácido glutárico. El grupo protector preferido para la formación del medio éster es el grupo bencílico. Los medio ésteres de PEG de ácido bis dicarboxílico resultantes se convierten en compuestos carboxi más reactivos tales como cloruros de acilo o ésteres activos, p. ej., ésteres de pentafluorofenilo o N-hidroxisuccinimida, se prefieren más los ésteres de N-hidroxisuccinimida, cuya estructura seleccionada preferida se muestra a continuación.



Alternativamente, los medio ésteres de PEG de ácido bis dicarboxílico se pueden activar en presencia de un agente acoplador tal como DCC o HOBT o PyBOP.

En una realización alternativa, el reactivo de cadena principal llevar grupos carboxi y el reactivo reticulador correspondiente se seleccionaría de cadenas de PEG terminadas en amino que contienen éster.

El reactivo de cadena principal y el reactivo reticulador se pueden polimerizar para formar el hidrogel según la invención mediante el uso de polimerización en emulsión inversa. Después de seleccionar la estequiometría deseada entre los grupos funcionales de cadena principal y reticulador, la cadena principal y el reticulador se disuelven en DMSO y se emplea un emulgador con un valor HLB seleccionado adecuadamente, preferiblemente Arlacel P135, para formar una emulsión inversa mediante el uso de un agitador mecánico y controlando la velocidad de agitación. La polimerización se inicia mediante la adición de una base adecuada, preferiblemente mediante

N,N,N',N'-tetrametiletileno diamina. Después de agitar durante una cantidad de tiempo adecuada, la reacción se aplaca mediante la adición de un ácido, tal como ácido acético y agua. Se recogen las perlas, se lavan y se fraccionan según el tamaño de partícula mediante tamizaje mecánico. Opcionalmente, se pueden retirar grupos protectores en esta etapa.

- 5 Además, dicho hidrogel según la invención se puede funcionalizar con un espaciador que lleva un grupo reactivo funcional diferente que el proporcionado por el hidrogel. Por ejemplo, se pueden introducir grupos reactivos funcionales maleimida en el hidrogel al acoplar un espaciador heterobifuncional adecuado tal como Mal-PEG6-NHS con el hidrogel. Dicho hidrogel funcionalizado se puede conjugar adicionalmente con reactivos de exendina-enlazador que llevan un grupo reactivo tiol en el resto enlazador para formar profármacos de exendina enlazados a hidrogel según la presente invención.

Después de cargar el conjugado de exendina-enlazador al hidrogel que contiene el grupo maleimido funcionalizado, todos los grupos funcionales restantes se cubren con un reactivo bloqueador adecuado, tal como mercaptoetanol, para evitar reacciones secundarias indeseadas.

- 15 En otra realización preferida de la invención, un conjugado de exendina-enlazador que lleva un tiol libre se conecta con el resto enlazador, se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C, con mayor preferencia, a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8, preferiblemente pH 6,5-7,5. Posteriormente, el conjugado de fármaco-enlazador-hidrogel resultante se trata con un compuesto de bajo peso molecular que comprende un grupo tiol, preferiblemente con un compuesto que contiene tiol de 34-500 Da, lo más preferiblemente, con mercaptoetanol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C, con mayor preferencia, a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8, preferiblemente pH 6,5-7,5.

- 20 En otra realización preferida de la invención, un conjugado de exendina-enlazador que lleva un grupo maleimida se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con tiol según la invención a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C, con mayor preferencia, a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8, preferiblemente pH 6,5-7,5. Posteriormente, el conjugado de fármaco-enlazador-hidrogel resultante correspondiente se trata con un compuesto de bajo peso molecular que comprende un grupo maleimida, preferiblemente con un compuesto que contiene maleimida de 100-300 Da, p. ej., N-etil-maleimida, a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C, con mayor preferencia, a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8, preferiblemente pH 6,5-7,5.

- 30 Otro aspecto de la presente invención es un proceso que comprende las etapas de

(a) poner en contacto a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8 una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida con una disolución que comprende un reactivo de exendina-enlazador de la presente invención, en donde el grupo químico funcional de L2* comprende un grupo tiol, que resulta en un conjugado de exendina-enlazador-hidrogel;

- 35 (b) opcionalmente, tratar el conjugado de exendina-enlazador-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene tiol de 34 Da a 500 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8.

Otro aspecto de la presente invención es un proceso que comprende las etapas de

- 40 (a) poner en contacto a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8 una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol con una disolución que comprende un reactivo de exendina-enlazador de la presente invención, en donde el grupo químico funcional de L2* comprende un grupo maleimida, que resulta en un conjugado de exendina-enlazador-hidrogel;

- 45 (b) opcionalmente, tratar el conjugado de exendina-enlazador-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene maleimida de 100 a 300 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8.

Un método particularmente preferido para la preparación de un profármaco de la presente invención comprende las etapas de

- 50 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula $C(A'-X^1)_4$, en donde $A'-X^1$ representa A antes de su unión a Hyp o un precursor de Hyp y X^1 es un grupo funcional adecuado, con un compuesto de fórmula $Hyp'-X^2$, en donde $Hyp'-X^2$ representa Hyp antes de su unión a A o un precursor de Hyp y X^2 es un grupo funcional adecuado para hacer reacción con X^1 ;

(b) opcionalmente, hacer reaccionar el compuesto resultante de la etapa (a) en una o más etapas adicionales para proporcionar un compuesto de fórmula $C(A-Hyp)_4$ que tiene al menos cuatro grupos funcionales;

(c) hacer reaccionar los al menos cuatro grupos funcionales del compuesto resultante de la etapa (b) con un precursor reticulador basado en poli(etilenglicol), en donde los grupos éster activos del precursor reticulador se usan en una cantidad subestequiométrica en comparación con la cantidad total de grupos reactivos funcionales de C(A-Hyp)₄ para proporcionar un hidrogel;

5 (d) hacer reaccionar los grupos funcionales que no hicieron reacción restantes (que representan los grupos reactivos funcionales de la cadena principal comprendidos en el hidrogel) en la cadena principal del hidrogel de la etapa (c) con un conjugado covalente de resto biológicamente activo y enlazador de profármaco transitorio o primero hacer reaccionar los grupos funcionales que no hicieron reacción con el enlazador de profármaco transitorio y posteriormente con el resto biológicamente activo;

10 (e) opcionalmente, cubrir los grupos funcionales que no hicieron reacción restantes para proporcionar un profármaco de la presente invención.

Específicamente, los hidrogeles para los profármacos de exendina de la presente invención se sintetizan de la siguiente manera:

15 Para la polimerización a granel, el reactivo de cadena principal y el reactivo reticulador se mezclan en una relación entre amina/éster activo de 2:1 a 1,05:1.

El reactivo de cadena principal y el reactivo reticulador se disuelven en DMSO para proporcionar una disolución con una concentración de 5 a 50 g por 100 mL, preferiblemente, 7,5 a 20 g por 100 ml y, lo más preferiblemente, 10 a 20 g por 100 ml.

20 Para que se produzca la polimerización, se agrega al 2 a 10 % (vol.) N,N,N',N'-tertrametileno diamina (TMEDA) a la disolución de DMSO que contiene el reactivo reticulador y el reactivo de cadena principal y la mezcla se agita durante 1 a 20 seg y se deja reposar. La mezcla se solidifica en menos de 1 min.

Dicho hidrogel según la invención preferiblemente se desmenuza mediante procesos mecánicos tales como agitación, trituración, corte con compresión o molienda, y opcionalmente, tamizaje.

Para la polimerización en emulsión, la mezcla de reacción comprende la fase dispersa y la fase continua.

25 Para la fase dispersa, el reactivo de cadena principal y el reactivo reticulador se mezclan en una relación entre amina/éster activo de 2:1 a 1,05:1 y se disuelven en DMSO para proporcionar una para proporcionar una disolución con una concentración de 5 a 50 g por 100 mL, preferiblemente, 7,5 a 20 g por 100 ml y, lo más preferiblemente, 10 a 20 g por 100 ml.

30 La fase continua es cualquier disolvente, que no es miscible con DMSO, no básico, aprótico y exhibe una viscosidad menor que 10 Pa*s. Preferiblemente, el disolvente, no es miscible con DMSO, no básico, aprótico y exhibe una viscosidad menor que 2 Pa*s y es no tóxico. Más preferiblemente, el disolvente es un hidrocarburo lineal o ramificado saturado con 5 a 10 átomos de carbono. Lo más preferiblemente, el disolvente es n-heptano.

35 Para formar una emulsión de la fase dispersa en la fase continua, se agrega un emulsionante a la fase continua antes de agregar la fase dispersa. La cantidad de emulsionante es 2 a 50 mg por mL de fase dispersa, más preferiblemente, 5 a 20 mg por mL de fase dispersa, lo más preferiblemente, 10 mg por mL de fase dispersa.

40 El emulsionante tiene un valor HLB de 3 a 8. Preferiblemente, el emulsionante es un triéster de sorbitol y un ácido graso o un conjugado de poli(hidroxil ácido graso)-poli(etilenglicol). Más preferiblemente, el emulsionante es un conjugado de poli(hidroxi-ácido graso)-polietilenglicol, con un poli(etilenglicol) lineal con un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa y unidades de poli(hidroxi-ácido graso) con un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 3 kDa en cada extremo de la cadena. Lo más preferiblemente, el emulsionante es estearato de poli(etilenglicol) dipolihidroxi, Cithrol DPHS (Cithrol DPHS, antiguamente Arlacel P135, Croda International Pic).

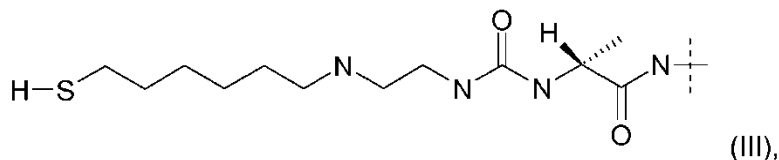
45 Se generan gotas de la fase dispersa mediante agitación con un propulsor de flujo axial con una geometría similar a agitadores tales como Isojet, Intermig, Propeller (EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Alemania)), lo más preferiblemente, similares a Isojet con un diámetro de 50 a 90 % del diámetro del reactor. Preferiblemente, la agitación se inicia antes de la adición de la fase dispersa. La velocidad del agitador se fija en 0,6 a 1,7 m/s. La fase dispersa se agrega a temperatura ambiente, y la concentración de la fase dispersa es 2 % a 70 %, preferiblemente, 5 a 50 %, más preferiblemente, 10 a 40 % y, lo más preferiblemente, 20 a 35 % del volumen de reacción total. La mezcla de la fase dispersa, el emulsionante y la fase continua se agita durante 5 a 60 min antes de agregar la base para producir la polimerización.

50 Se agregan 5 a 10 equivalentes (en referencia a cada unión amida que se va a formar) de una base a la mezcla de fase dispersa y continua. La base es aprótica, no nucleófila y soluble en la fase dispersa. Preferiblemente, la base es aprótica, no nucleófila, soluble en la fase dispersa y DMSO. Más preferiblemente, la base es aprótica, no nucleófila, soluble en la fase dispersa y DMSO, una base amina y no tóxica. Lo más preferiblemente, la base es N,N,N',N'-

tertrametiletileno diamina (TMEDA, por sus siglas en inglés). La agitación en presencia de la base se continúa durante 1 a 16 h.

5 Durante la agitación, se endurecen gotas de fase dispersa para que se conviertan en perlas de hidrogel reticulado según la invención que se pueden recoger y el fraccionamiento según el tamaño se lleva a cabo en una máquina de tamizaje continuo vibratoria con una plataforma de 75 μm y 32 μm para proporcionar micropartículas de hidrogel según la invención.

Otro aspecto de la presente invención es un intermediario de conjugado de exendina-enlazador D-L', en donde L' es de fórmula (III)



10 en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

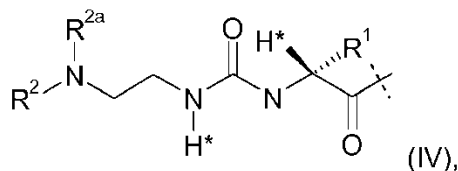
D representa una exendina y

15 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida.

Otro aspecto de la presente invención son reactivos de exendina-enlazador D-L*, en donde

D representa un resto exendina; y

L* es un reactivo enlazador no biológicamente activo representado por la fórmula (IV),



20 en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₄;

R², R^{2a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,

25 en donde L* se sustituye con una L^{2*} y opcionalmente se sustituye adicionalmente, siempre que los hidrógenos marcados con los asteriscos en la fórmula (IV) no se reemplacen con un sustituyente y en donde

L^{2*} es un espaciador conectado con L* y que comprende un grupo químico funcional previsto para la conjugación con un hidrogel;

30 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida; y

35 en donde el grupo químico funcional se selecciona de ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol y derivados, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácido fosfónico y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, acrililo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes arilantes como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de diazoacetilo, oxirano y aziridina.

Preferiblemente, R² en la fórmula (IV) se reemplaza por L^{2*}.

40 Preferiblemente, L* en la fórmula (IV) no se sustituye adicionalmente.

Preferiblemente, L^{2*} comprende un grupo tiol.

Preferiblemente, L^{2*} comprende un grupo maleimida.

5 El hidrogel para el profármaco de la presente invención se puede obtener a partir de los métodos de preparación en la forma de un artículo conformado, tal como una malla o un resorte o micropartículas. Lo más preferiblemente, se da forma de perlas microparticuladas al hidrogel que se pueden administrar como inyección subcutánea o intramuscular por medio de una jeringa estándar. Dichas perlas blandas pueden tener un diámetro de entre 1 y 500 micrómetros.

10 Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro de entre 10 y 100 micrómetros si se suspenden en un tampón de formulación acuosa isotónica, más preferiblemente, un diámetro de entre 20 y 100 micrómetros, lo más preferiblemente, un diámetro de entre 25 y 80 micrómetros.

15 Preferiblemente, las micropartículas se pueden administrar mediante inyección a través de una aguja con menos de 0,6 mm de diámetro interno, preferiblemente, a través de una aguja con menos de 0,3 mm de diámetro interno, más preferiblemente, a través de una aguja con menos de 0,225 mm de diámetro interno, incluso más preferiblemente, a través de una aguja con menos de 0,175 mm de diámetro interno y, lo más preferiblemente, a través de una aguja con menos de 0,16 mm de diámetro interno.

20 Se entiende que los términos "se puede administrar mediante inyección", "inyectable" o "capacidad de inyectarse" se refieren a una combinación de factores tales como cierta fuerza aplicada a un émbolo de una jeringa que contiene el hidrogel biodegradable según la invención hinchado en un líquido a una cierta concentración (p/v) y a una cierta temperatura, una aguja de un diámetro interno dado conectada con la salida de dicha jeringa, y el tiempo necesario para extruir un cierto volumen del hidrogel biodegradable según la invención desde la jeringa a través de la aguja.

25 Para proporcionar la capacidad de inyectarse, un volumen de 1 mL de profármacos de exendina según la invención hinchado en agua hasta una concentración de al menos 5 % (p/v) y contenido en una jeringa con un émbolo de un diámetro de 4,7 mm se puede extruir a temperatura ambiente en 10 segundos al aplicar una fuerza menor que 50 Newton.

Preferiblemente, la capacidad de inyectarse se logra para un profármaco de exendina según la invención hinchado en agua hasta una concentración de aproximadamente 10 % (p/v).

Otro aspecto de la presente invención es un proceso para preparar un profármaco inyectable por aguja que comprende la etapa de

- (a) preparar un profármaco de hidrogel de exendina de la presente invención en forma de micropartículas;
- 30 (b) tamizar las micropartículas
- (c) seleccionar una fracción con un diámetro de perla de profármaco de entre 25 y 80 μm .
- (d) suspender la fracción de perla de la etapa (c) en una disolución de tampón acuosa adecuada para inyección.

35 Otro aspecto de la presente invención es un profármaco inyectable por aguja que se pueden obtener a partir del proceso descrito anteriormente, en donde el profármaco inyectable por aguja se puede inyectar a través de una aguja con un diámetro interno de menos de 300 μm , preferiblemente, a través de una aguja con un diámetro interno de menos de 225 μm y, más preferiblemente, a través de una aguja con un diámetro interno de menos de 175 μm .

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un profármaco de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se describe adicionalmente en los siguientes párrafos.

40 La composición de un profármaco de exendina-hidrogel se puede proporcionar como una composición en suspensión o como una composición seca. Preferiblemente, la composición farmacéutica de profármaco de exendina-hidrogel es una composición seca. Los métodos adecuados para secar son, por ejemplo, secado por pulverización y liofilización (secado por congelamiento). Preferiblemente, la composición farmacéutica de profármaco de exendina-hidrogel se seca mediante liofilización.

45 Preferiblemente, el profármaco de hidrogel de exendina se dosifica de manera suficiente en la composición para proporcionar la cantidad terapéuticamente eficaz de exendina durante al menos tres días en una aplicación. Más preferiblemente, una aplicación del profármaco de hidrogel de exendina es suficiente durante una semana.

La composición farmacéutica de profármaco de hidrogel de exendina según la presente invención contiene uno o más excipientes.

50 Los excipientes que se usan en composiciones parenterales se pueden categorizar como agentes tampón, modificadores de isotonicidad, conservantes, estabilizadores, agentes antiadsorción, agentes de protección contra

oxidación, viscosificadores/agentes potenciadores de la viscosidad u otros agentes auxiliares. En algunos casos, estos ingredientes pueden tener funciones dobles o triples. Las composiciones de profármacos de hidrogel de exendina según la presente invención contienen uno o más de un excipiente, seleccionado de los grupos que consisten en:

- 5 (i) Agentes tampón: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un intervalo deseado, tal como fosfato de sodio, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad del tampón se puede ajustar para coincidir con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.
- 10 (ii) Modificadores de la isotonicidad: para minimizar el dolor que puede resultar del daño celular debido a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección. Los ejemplos son glicerina y cloruro de sodio. Las concentraciones eficaces se pueden determinar mediante osmometría usando una osmolalidad asumida de 285-315 mOsmol/kg para el suero.
- 15 (iii) Conservantes y/o antimicrobianos: las preparaciones parenterales multidosis requieren la adición de conservantes en una concentración suficiente para minimizar el riesgo de que los pacientes se infecten después de una inyección y se han establecido requisitos regulatorios correspondientes. Los conservantes típicos incluyen m-cresol, fenol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato fenilmercuríco, timerosol, ácido sórbico, sorbato potásico, ácido benzoico, clorocresol y cloruro de benzalconio.
- 20 (iv) Estabilizadores: La estabilización se logra al fortalecer las fuerzas que estabilizan a la proteína, mediante la desestabilización del estado desnaturalizado, o mediante unión directa de excipientes a la proteína. Los estabilizadores pueden ser aminoácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, azúcares tales como glucosa, sacarosa, trehalosa, polioles tales como glicerol, manitol, sorbitol, sales tales como fosfato de potasio, sulfato de sodio, agentes quelantes tales como EDTA, hexafosfato, ligandos tales como iones metálicos divalentes (cinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas tales como derivados fenólicos. Además, se pueden usar oligómeros o polímeros tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, PEG o PVP o protamina o HSA.
- 25 (v) Agentes antiadsorción: Se usan principalmente tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles para recubrir o adsorber competitivamente en la superficie interna de la composición o el contenedor de la composición. P. ej., poloxámero (Pluronic F-68), éter dodecilo de PEG (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilenglicol, PEG-poli-histidina, BSA y HSA y gelatinas. La concentración elegida y el tipo de excipiente dependen del efecto que se va a evitar, pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfaz apenas por encima del valor CMC.
- 30 (vi) Lio y/o crioprotectores: Durante la liofilización o secado por pulverización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizadores causados por la ruptura de la unión hidrógeno y la eliminación del agua. Con este fin, se pueden usar azúcares y polioles, pero también se han observado efectos positivos correspondientes para tensioactivos, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trehalosa es particularmente eficaz en la reducción de la aglomeración inducida por la humedad y también mejora la estabilidad térmica posiblemente causada por la exposición de grupos hidrófobos de proteína al agua. También se pueden usar manitol y sacarosa, tanto como lio/crioprotector único o en combinación entre sí donde se sabe que relaciones más altas de manitol:sacarosa potencian la estabilidad física de una torta liofilizada. El manitol también se puede combinar con trehalosa. La trehalosa también se pueden combinar con sorbitol o el sorbitol se puede usar como protector único. También se pueden usar almidón o derivados de almidón.
- 35 (vii) Agentes de protección contra la oxidación: antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monoglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico.
- 40 (viii) Viscosificadores o potenciadores de la viscosidad: retardan el asentamiento de las partículas en el vial y la jeringa y se usan para facilitar la mezcla y resuspensión de las partículas y para hacer que la suspensión se inyecte con mayor facilidad (es decir, poca fuerza sobre el émbolo de la jeringa). Los viscosificadores o potenciadores de la viscosidad adecuados son, por ejemplo, viscosificadores de carbómero como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o dietilaminoetilcelulosa (DEAE o DEAE-C), silicato de magnesio coloidal (Veegum) o silicato de sodio, gel de hidroxiapatita, gel de fosfato tricálcico, xantanos, carragenanos como goma Satia UTC 30, poli(ácidos hidroxilo) alifáticos, tales como poli(D,L- o L-ácido láctico) (PLA) y poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA), terpolímeros de D,L-láctido, glicólido y caprolactona, poloxámeros, bloques de poli(oxietileno) hidrófilos y bloques de poli(oxipropileno) hidrófobos para conformar un tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (p. ej., Pluronic®), copolímero de poliéster, tal como copolímero de tereftalato de polietilenglicol/tereftalato de polibutileno, acetato isobutirato de sacarosa (SAIB), dextrano o derivados de estos, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, quitosano, alcohol polivinílico (PVA) y derivados, polialquilimidaz, poli (acrilamida-co-dialildimetil amonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glicosaminoglicanos (GAGs) tales como sulfato de dermatán, sulfato de condroitina, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparán, hialuronano, copolímeros de tribloque ABA o de bloque AB compuestos
- 45
- 50
- 55

por bloques A hidrófobos, tales como poliláctido (PLA) o poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) y bloques B hidrófilos, tales como polietilenglicol (PEG) o polivinilpirrolidona. Dichos copolímeros de bloque, así como los poloxámeros mencionados anteriormente pueden exhibir comportamiento de gelificación térmica inversa (estado fluido a temperatura ambiente para facilitar la administración y estado de gel por encima de la temperatura de transición sol-gel a temperatura corporal después de la inyección).

(ix) Agente de extensión o difusión: modifica la permeabilidad del tejido conjuntivo a través de la hidrólisis de componentes de la matriz extracelular en el espacio intersticial tal como, pero sin limitarse a, ácido hialurónico, un polisacárido hallado en el espacio intercelular del tejido conjuntivo. Un agente de extensión tal como, pero sin limitarse a, hialuronidasa reduce temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular y promueve la difusión de fármacos inyectados.

(x) Otros agentes auxiliares: tales como agentes humectantes, modificadores de la viscosidad, antibióticos, hialuronidasa. Los ácidos y bases tales como ácido clorhídrico e hidróxido de sodio son agentes auxiliares necesario para el ajuste del pH durante la fabricación.

Preferiblemente, la composición de profármaco de hidrogel de exendina contiene uno o más de un viscosificador y/o agente modificador de la viscosidad.

El término "excipiente" preferiblemente hace referencia a un diluyente, adyuvante o vehículo con el cual se administra el producto terapéutico. Dicho excipiente farmacéutico puede ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético que incluyen, pero no se limitan a, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra oralmente. La disolución salina y la dextrosa acuosa son los excipientes preferidos cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las disoluciones salinas y la dextrosa acuosa y las disoluciones de glicerol se emplean preferiblemente como excipientes líquidos para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón para el pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y excipientes tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir excipientes estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente para proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al método de administración de una composición de profármaco de hidrogel de exendina reconstituida. La composición de profármaco de hidrogel de exendina se puede administrar mediante métodos de inyección o infusión, incluida intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea e intraperitoneal.

Otro aspecto de la presente invención es un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante exendina. Dichas composiciones son para su uso en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos conocidos para exendina o agonistas de exendina, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de la hiperglucemia y para el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus de cualquier tipo, p. ej., diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes mellitus no insulino dependiente, prediabetes o diabetes mellitus gestacional, para la prevención y el tratamiento del síndrome metabólico y/u la obesidad y/o trastornos de la alimentación, síndrome de resistencia a la insulina, bajar el nivel de lípidos en plasma, reducir el riesgo cardíaco, reducir el apetito, reducir el peso corporal, etc.

Los pacientes que necesitan tratamiento con las composiciones de exendina de acción prolongada descritas en la presente invención están en riesgo alto de desarrollar enfermedades concomitantes. Por consiguiente, la combinación de la exendina de acción prolongada de la presente con compuestos bioactivos adecuados se puede usar, p. ej., para la prevención, retraso de la progresión o tratamiento de enfermedades o trastornos seleccionados del grupo que consiste en hipertensión (incluidas, pero sin limitarse a, hipertensión sistólica aislada e hipertensión dislipidémica familiar), insuficiencia cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad arterial periférica, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, insuficiencia renal crónica, neuropatía diabética, síndrome X, síndrome premenstrual, cardiopatía coronaria, angina de pecho, trombosis, aterosclerosis, infarto de miocardio, ataques isquémicos transitorios, accidente cerebrovascular, restenosis vascular, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, afecciones de tolerancia alterada de la glucosa, afecciones de

glucosa en plasma en ayunas alterada, obesidad, disfunción eréctil, trastornos cutáneos y del tejido conjuntivo, úlceras del pie y colitis ulcerosa, disfunción endotelial y distensibilidad vascular alterada.

La prevención, retraso de la progresión o tratamiento de enfermedades y trastornos seleccionados del grupo mencionado anteriormente se pueden lograr mediante la combinación de la composición de exendina de acción prolongada de la presente invención con al menos un compuesto bioactivo seleccionado de las clases de fármaco que se usan para tratar dichas afecciones, incluidos antagonistas del receptor de AT₁; inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA); inhibidores de renina; bloqueadores del receptor beta adrenérgico; bloqueadores del receptor alfa adrenérgico; bloqueadores de los canales de calcio; inhibidores de aldosterona sintasa; antagonistas del receptor de aldosterona; inhibidores de endopeptidasa (EPN) neutra; inhibidores dobles de enzima convertidora de angiotensina/endopeptidasa neutra (ECA/EPN); antagonistas del receptor de endotelina; diuréticos; estatinas; nitratos; agentes anticoagulantes; péptidos natriurético; compuestos digitálicos; moduladores de PPAR.

En caso de que los agentes biológicamente activos; profármacos, especialmente profármacos de hidrogel, contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus sales farmacéuticamente o toxicológicamente aceptables correspondientes, en particular, sus sales farmacéuticamente utilizables. Por lo tanto, los profármacos que contienen grupos ácidos se pueden usar según la invención, por ejemplo, como sales de metal alcalino, sales de metal alcalinotérreo o como sales de amonio. Los ejemplos más precisos de dichas sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoniaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanol, trietanolamina o aminoácidos. Los profármacos que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que pueden estar protonados, pueden estar presentes y se pueden usar según la invención en la forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico, y otros ácidos conocidos para el experto en la técnica. Si los profármacos contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betainas (zwitteriones). Las respectivas sales se pueden obtener mediante métodos habituales que son conocidos para el experto en la técnica como, por ejemplo, al ponerlas en contacto con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o mediante intercambio aniónico o intercambio catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de profármacos que, debido a la baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en productos farmacéuticos, pero que se pueden usar, por ejemplo, como intermediarios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora tal como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE. UU.) y/o cualquier otra agencia reguladora nacional para su uso en animales, preferiblemente, en humanos.

Otro aspecto de la presente invención es un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de esta para su uso en un método para tratar, controlar, retrasar o prevenir en un paciente mamífero, preferiblemente en un humano, que necesita tratamiento para una o más afecciones que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho profármaco o dicha composición farmacéutica o dicha sal farmacéuticamente aceptable de esta. La Figura 1 muestra la cinética de liberación de los compuestos 8, 10, 12, 14 y 16 a pH 7,4, 37 °C.

Ejemplos

Materiales y métodos

Se obtuvo Exendina-4 [Seq ID No:1] sobre resina (carga de aprox. 0,1 mmol/g) sintetizada mediante la estrategia Fmoc de CASLO Laboratory Aps, Lyngby, Dinamarca. Se obtuvieron Lixisenatida [Seq ID No 21] y GLP-1 [Seq ID No 13] sobre resina (carga de aprox. 0,1 mmol/g) sintetizadas mediante la estrategia Fmoc de Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Alemania. Los péptidos estaban completamente protegidos en la cadena lateral y tenían el extremo N libre.

Se obtuvo Amino PEG de 4 brazos de 5kDa de JenKem Technology, Beijing, R. P. China. Se obtuvo el éster NHS de ácido N-(3-maleimidopropil)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoico (Mal-PEG6-NHS) de Celares GmbH, Berlín, Alemania. Se adquirió el ácido 6-(S-tritilmercapto)hexanoico a Polypeptide, Estrasburgo, Francia. Los aminoácidos que se usaron tenían la configuración L, a menos que se indique lo contrario.

Todas las otras sustancias químicas fueron de Sigma-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania.

Desprotección de Fmoc:

Para retirar el grupo protector Fmoc, la resina se agitó con 2/2/96 (v/v/v) piperidina/DBU/DMF (dos veces, 10 min cada una) y se lavó con DMF (diez veces).

Purificación por RP-HPLC:

La RP-HPLC se llevó a cabo en una columna de 100x20 mm o 100x40 mm C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 5 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania) conectada a un sistema de HPLC Waters 600 y detector de absorbancia Waters 2487, a menos que se indique de cualquier otra manera. Se usaron gradientes lineales de la disolución A (0,1 % de TFA en H₂O) y disolución B (0,1 % de TFA en acetonitrilo). Las fracciones de HPLC que contenían producto se concentraron y liofilizaron.

Cromatografía rápida

Las purificaciones por cromatografía rápida se llevaron a cabo en un sistema Isolera One de Biotage AB, Suecia, usando cartuchos de sílice Biotage KP-Sil y como eluyentes n-heptano y acetato de etilo. Los productos se detectaron a 254 nm.

Para las perlas de hidrogel, se usaron jeringas equipadas con fritas de polietileno como recipientes de reacción o para las etapas de lavado.

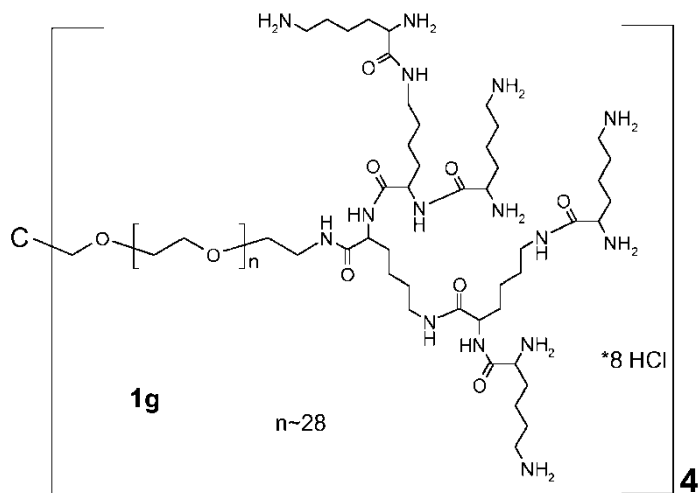
Se llevó a cabo LC de alto rendimiento analítica (UPLC) en un sistema Waters Acquity equipado con una columna Waters BEH300 C18 (2,1 x 50 mm, tamaño de partícula 1,7 µm) acoplada a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Discovery de Thermo Scientific.

Los MS de productos PEG exhibieron una serie de restos (CH₂CH₂O)_n debido a la polidispersidad de los materiales de partida de PEG. Para una interpretación más fácil, solo se proporciona una señal m/z representativa única en los ejemplos.

Contenido peptídico del hidrogel: El contenido peptídico se expresa como el % en peso de péptido en relación con el peso bruto del hidrogel (suma del peso del hidrogel funcionalizado con maleimida y el enlazador peptídico tiol). El peso del enlazador peptídico tiol en hidrogel (y, por lo tanto, el peso del péptido solo) se determinó mediante el consumo del enlazador peptídico tiol durante la reacción de conjugación con el hidrogel funcionalizado con maleimida. El consumo del enlazador peptídico tiol se determinó mediante la prueba de Ellman (Ellman, G. L. et al., Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 88-95).

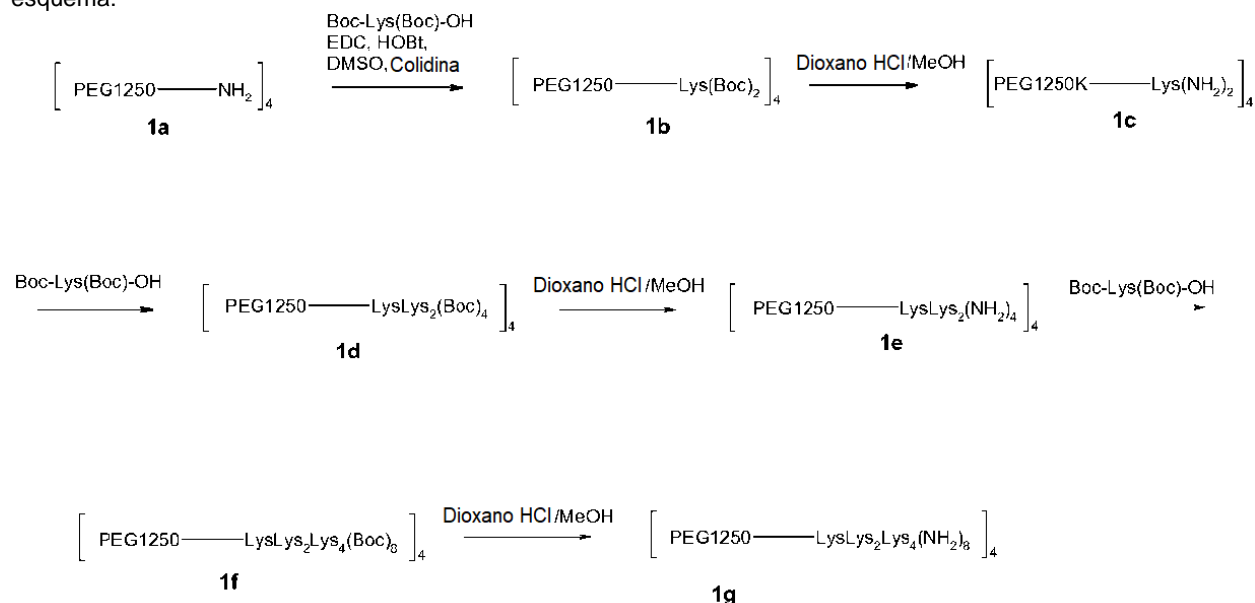
Ejemplo 1

Síntesis del reactivo de cadena principal 1g



ES 2 733 734 T3

El reactivo de cadena principal 1g se sintetizó a partir de amino PEG5000 de 4 brazos 1a según el siguiente esquema:



5 Para la síntesis del compuesto 1b, se disolvió amino PEG5000 de 4 brazos 1a (PM aprox. 5200 g/mol, 5,20 g, 1,00 mmol, sal de HCl) en 20 mL de DMSO (anhidro). Se agregaron Boc-Lys(Boc)-OH (2,17 g, 6,25 mmol) en 5 mL de DMSO (anhidro), EDC HCl (1,15 g, 6,00 mmol), HOBt·H₂O (0,96 g, 6,25 mmol) y colidina (5,20 mL, 40 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a RT.

10 La mezcla de reacción se diluyó con 1200 mL de DCM y se lavó con 600 mL de 0,1 N H₂SO₄ (2 veces), salmuera (1 vez), 0,1 M NaOH (2 veces) y 1/1 (v/v) salmuera/agua (4 veces). Las capas acuosas se reextrajeron con 500 mL de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para proporcionar 6,3 g de producto bruto 1b como aceite incoloro. El compuesto 1b se purificó mediante RP-HPLC.

Proporcionó 3,85 g (59 %) de producto incoloro vidrioso 1b.

MS: m/z 1294,4 = [M+5H]⁵⁺ (PM calculado para [M+5H]⁵⁺ = 1294,6).

15 El compuesto 1c se obtuvo al agitar 3,40 g del compuesto 1b (0,521 mmol) en 5 mL de metanol y 9 mL de 4 N HCl en dioxano a RT durante 15 min. Los volátiles se retiraron al vacío. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 1151,9 = [M+5H]⁵⁺ (PM calculado para [M+5H]⁵⁺ = 1152,0).

20 Para la síntesis del compuesto 1d, se disolvieron 3,26 g de compuesto 1c (0,54 mmol) en 15 mL de DMSO (anhidro). Se agregaron 2,99 g de Boc-Lys(Boc)-OH (8,64 mmol) en 15 mL de DMSO (anhidro), 1,55 g de EDC HCl (8,1 mmol), 1,24 g de HOBt·H₂O (8,1 mmol) y 5,62 mL de colidina (43 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a RT. La mezcla de reacción se diluyó con 800 mL de DCM y se lavó con 400 mL de 0,1 N H₂SO₄ (2 veces), salmuera (1 vez), 0,1 M NaOH (2 veces) y 1/1 (v/v) salmuera/agua (4 veces). Las capas acuosas se reextrajeron con 800 mL de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para proporcionar un producto bruto vidrioso.

25 El producto se disolvió en DCM y se precipitó con éter dietílico enfriado (-18 °C). Este procedimiento se repitió dos veces y el precipitado se secó al vacío.

Rendimiento: 4,01 g (89 %) de producto incoloro vidrioso 1d, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 1405,4 = [M+6H]⁶⁺ (PM calculado para [M+6H]⁶⁺ = 1405,4).

30 El compuesto 1e se obtuvo al agitar una disolución del compuesto 1d (3,96 g, 0,47 mmol) en 7 mL de metanol y 20 mL de 4 N HCl en dioxano a RT durante 15 min. Los volátiles se retiraron al vacío. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 969,6 = [M+7H]⁷⁺ (PM calculado para [M+7H]⁷⁺ = 969,7).

35 Para la síntesis del compuesto 1f, se disolvió el compuesto 1e (3,55 g, 0,48 mmol) en 20 mL de DMSO (anhidro). Se agregaron Boc-Lys(Boc)-OH (5,32 g, 15,4 mmol) en 18,8 mL de DMSO (anhidro), EDC HCl (2,76 g, 14,4 mmol),

HOBt·H₂O (2,20 g, 14,4 mmol) y 10,0 mL de colidina (76,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 min a RT.

La mezcla de reacción se diluyó con 800 mL de DCM y se lavó con 400 mL de 0,1 N H₂SO₄ (2 veces), salmuera (1 vez), 0,1 M NaOH (2 veces) y 1/1 (v/v) salmuera/agua (4 veces). Las capas acuosas se reextrajeron con 800 mL de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para proporcionar el producto bruto 1f como aceite incoloro.

El producto se disolvió en DCM y se precipitó con éter dietílico enfriado (-18 °C). Esta etapa se repitió dos veces y el precipitado se secó al vacío.

Rendimiento: 4,72 g (82 %) de producto incoloro vidrioso 1f, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 1505,3 = [M+8H]⁸⁺ (PM calculado para [M+8H]⁸⁺ = 1505,4).

El reactivo de cadena principal 1g se obtuvo al agitar una disolución del compuesto 1f (PM aprox. 12035 g/mol, 4,72 g, 0,39 mmol) en 20 mL de metanol y 40 mL de 4 N HCl en dioxano a RT durante 30 min. Los volátiles se retiraron al vacío.

Rendimiento: 3,91 g (100 %), reactivo de cadena principal de producto vidrioso 1g.

MS: m/z 977,2 = [M+9H]⁹⁺ (PM calculado para [M+9H]⁹⁺ = 977,4).

Vía sintética alternativa para 1g

Para la síntesis del compuesto 1b, a una suspensión de PEG5000 tetraamina de 4 brazos (1a) (50,0 g, 10,0 mmol) en 250 mL de iPrOH (anhidro), se agregaron boc-Lys(boc)-OSu (26,6 g, 60,0 mmol) y DIEA (20,9 mL, 120 mmol) a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min.

Posteriormente, se agregó n-propilamina (2,48 mL, 30,0 mmol). Después de 5 min, la disolución se diluyó con 1000 mL de MTBE y se almacenó durante toda la noche a -20 °C sin agitación. Se decantaron y desecharon aproximadamente 500 mL del sobrenadante. Se agregaron 300 mL de MTBE frío y después de 1 min de agitación, el producto se recogió mediante filtración a través de un filtro de vidrio y se lavó con 500 mL de MTBE frío. El producto se secó al vacío durante 16 h.

Rendimiento: 65,6 g (74 %) de 1b como sólido grumoso blanco

MS: m/z 937,4 = [M+7H]⁷⁺ (PM calculado para [M+7H]⁷⁺ = 937,6).

El compuesto 1c se obtuvo al agitar el compuesto 1b de la etapa anterior (48,8 g, 7,44 mmol) en 156 mL de 2-propanol a 40 °C. Se agregó una mezcla de 196 mL de 2-propanol y 78,3 mL de acetilcloruro con agitación en 1-2 min. La disolución se agitó a 40 °C durante 30 min y se enfrió hasta -30 °C durante toda la noche sin agitación. Se agregaron 100 mL de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se enfrió durante 1 h a -30 °C. El producto se recogió mediante filtración a través de un filtro de vidrio y se lavó con 200 mL de MTBE frío. El producto se secó al vacío durante 16 h.

Rendimiento: 38,9 g (86 %) de 1c como un polvo blanco

MS: m/z 960,1 = [M+6H]⁶⁺ (PM calculado para [M+6H]⁶⁺ = 960,2).

Para la síntesis del compuesto 1d, se agregaron boc-Lys(boc)-OSu (16,7 g, 37,7 mmol) y DIPEA (13,1 mL, 75,4 mmol) a una suspensión de 1c de la etapa anterior (19,0 g, 3,14 mmol) en 80 mL de 2-propanol a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min a 45 °C. Posteriormente, se agregó n-propilamina (1,56 mL, 18,9 mmol). Después de 5 min, la disolución se precipitó con 600 mL de MTBE frío y se centrifugó (3000 min⁻¹, 1 min). El precipitado se secó al vacío durante 1 h y se disolvió en 400 mL de THF. Se agregaron 200 mL de éter dietílico y el producto se enfrió hasta -30 °C durante 16 h sin agitación. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y se lavó con 300 mL de MTBE frío. El producto se secó al vacío durante 16 h.

Rendimiento: 21,0 g (80 %) de 1d como un sólido blanco

MS: m/z 1405,4 = [M+6H]⁶⁺ (PM calculado para [M+6H]⁶⁺ = 1405,4).

El compuesto 1e se obtuvo al disolver el compuesto 1d de la etapa anterior (15,6 g, 1,86 mmol) en 3 N HCl en metanol (81 mL, 243 mmol) y agitar durante 90 min a 40 °C. Se agregaron 200 mL de MeOH y 700 mL de iPrOH y la mezcla se almacenó durante 2 h a -30 °C. Para completar la cristalización, se agregaron 100 mL de MTBE y la suspensión se almacenó a -30 °C durante toda la noche. Se agregaron 250 mL de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se filtró a través de un filtro de vidrio y se lavó con 100 mL de MTBE frío. El producto se secó al vacío.

Rendimiento: 13,2 g (96 %) de 1e como un polvo blanco

MS: m/z 679,1 = [M+10H]¹⁰⁺ (PM calculado para [M+10H]¹⁰⁺ = 679,1).

- 5 Para la síntesis del compuesto 1f, se agregaron boc-Lys(boc)-OSu (11,9 g, 26,8 mmol) y DIPEA (9,34 mL, 53,6 mmol) a una suspensión de 1e de la etapa anterior (8,22 g, 1,12 mmol) en 165 ml de 2-propanol a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min. Posteriormente, se agregó n-propilamina (1,47 mL, 17,9 mmol). Después de 5 min, la disolución se enfrió hasta -18 °C durante 2 h, después se agregaron 165 mL de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se filtró a través de un filtro de vidrio. Posteriormente, la torta del filtro se lavó 4 veces con 200 mL de MTBE frío/iPrOH 4:1 y 1 vez con 200 mL de MTBE frío. El producto se secó al vacío durante 16 h.

Rendimiento: 12,8 g, PM (90 %) de 1f como sólido grumoso amarillo pálido

MS: m/z 1505,3 = [M+8H]⁸⁺ (PM calculado para [M+8H]⁸⁺ = 1505,4).

- 10 El reactivo de cadena principal 1g se obtuvo al disolver PEG5kDa de 4 brazos (-LysLys₂Lys₄(boc)₈)₄ (1f) (15,5 g, 1,29 mmol) en 30 mL de MeOH y enfriar hasta 0 °C. Se agregó 4 N HCl en dioxano (120 mL, 480 mmol, enfriado hasta 0 °C) en 3 min y se retiró el baño de hielo. Después de 20 min, se agregó 3 N HCl en metanol (200 mL, 600 mmol, enfriado hasta 0 °C) en 15 min y la disolución se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La disolución de producto se precipitó con 480 mL de MTBE frío y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El precipitado se secó al vacío durante 1 h y se redisolvió en 90 mL de MeOH, se precipitó con 240 mL de MTBE frío y la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El producto 1g se secó al vacío.

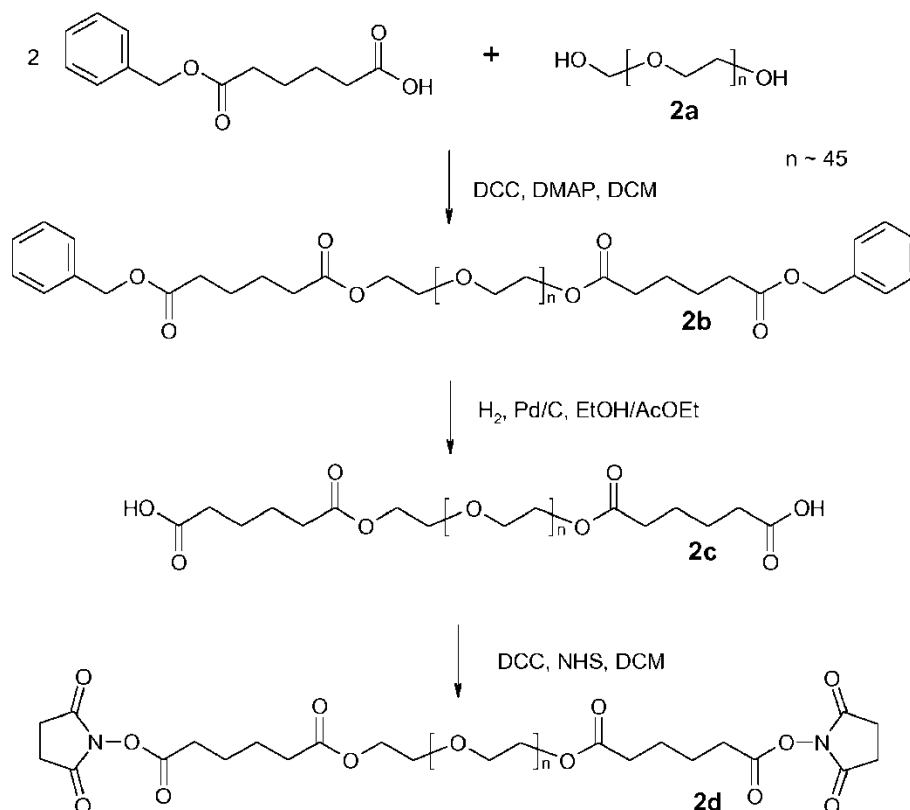
Rendimiento: 11,5 g (89 %) como copos amarillos pálidos.

MS: m/z 1104,9 = [M+8H]⁸⁺ (PM calculado para [M+8H]⁸⁺ = 1104,9).

Ejemplo 2

- 20 Síntesis del reactivo de reticulador 2d

El reactivo reticulador 2d se preparó a partir de éster monobencílico de ácido adípico (English, Arthur R. et al., Journal of Medicinal Chemistry, 1990, 33(1), 344-347) y PEG2000 según el siguiente esquema:



- 25 Se enfrió una disolución de PEG 2000 (2a) (11,0 g, 5,5 mmol) y medio éster de adipato bencílico (4,8 g, 20,6 mmol) en DCM (90,0 mL) hasta 0 °C. Se agregó dicitohexilcarbodiimida (4,47 g, 21,7 mmol) y posteriormente una cantidad catalítica de DMAP (5 mg) y la disolución se agitó y se dejó que alcanzase temperatura ambiente durante toda la noche (12 h). El matraz se almacenó a +4 °C durante 5 h. El sólido se filtró y el disolvente se retiró completamente mediante destilación al vacío. El residuo se disolvió en 1000 mL 1/1 (v/v) éter dietílico/acetato de etilo y se almacenó a RT durante 2 horas mientras se formó una pequeña cantidad de un sólido en escamas. El sólido se retiró por

filtración a través de una almohadilla de Celite®. La disolución se almacenó en un matraz cerrado herméticamente a -30 °C en el congelador durante 12 h hasta que se completó la cristalización. El producto cristalino se filtró a través de una frita de vidrio y se lavó con éter dietílico enfriado (-30 °C). La torta de filtro se secó al vacío.

5 Rendimiento: 11,6 g (86 %) de 2b como un sólido incoloro. El producto se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

MS: m/z 813,1 = [M+3H]³⁺ (PM calculado para [M+3H]³⁺ = 813,3).

10 En un autoclave de vidrio de 500 mL se disolvió éster de PEG2000-bis-ácido adípico-bis-bencilo 2b (13,3 g, 5,5 mmol) en acetato de etilo (180 mL) y se agregó 10 % de Paladio en carbón (0,4 g). La disolución se hidrogenó a 6 bar, 40 °C hasta que se detuvo el consumo de hidrógeno (5-12 h). El catalizador se retiró por filtración a través de una almohadilla de Celite® y el disolvente se evaporó al vacío.

Rendimiento: 12,3 g (cuantitativo) de 2c como un aceite amarillento. El producto se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

MS: m/z 753,1 = [M+3H]³⁺ (PM calculado para [M+3H]³⁺ = 753,2).

15 Una disolución de medio éster de PEG2000-bis-ácido adípico 2c (9,43 g, 4,18 mmol), N-hidroxisuccinimida (1,92 g, 16,7 mmol) y dicitlohexilcarbodiimida (3,44 g, 16,7 mmol) en 75 mL de DCM (anhidr) se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y el precipitado se retiró por filtración. Se evaporó DCM y el residuo se recrystalizó a partir de THF.

Rendimiento: 8,73 g (85 %) de reactivo reticulador 2d como un sólido incoloro.

MS: m/z 817,8 = [M+3H]³⁺ (PM calculado para [M+3H]³⁺ = 817,9 g/mol).

20 Ejemplo 3

Preparación de perlas de hidrogel (3) que contienen grupos amino libres

25 Una disolución de 1200 mg de 1g y 3840 mg de 2d en 28,6 mL de DMSO se agregó a una disolución de 425 mg de Arlcel P135 (Croda International Plc) en 100 mL de heptano. La mezcla se agitó a 650 rpm con un agitador propulsor durante 10 min a 25 °C hasta formar una suspensión en un reactor de 250 ml equipado con deflectores. Se agregaron 4,3 mL de TMEDA para producir la polimerización. Después de 2 h, se redujo la velocidad del agitador hasta 400 rpm y la mezcla se agitó durante 16 h adicionales. Se agregaron 6,6 mL de ácido acético y, a continuación, después de 10 min se agregaron 50 mL de agua y 50 mL de disolución de cloruro de sodio acuosa saturada. Después de 5 min, se detuvo el agitador y se drenó la fase acuosa.

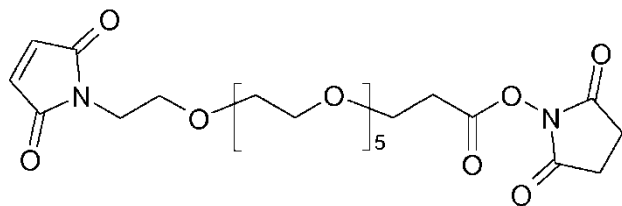
30 Para el fraccionamiento de tamaño de perla, la suspensión de agua-hidrogel se tamizó en húmedo sobre tamices de mala de acero de 75, 50, 40, 32 y 20 µm. Las fracciones de perla que se retuvieron en los tamices de 32, 40 y 50 µm se agruparon y se lavaron 3 veces con agua, 10 veces con etanol y se secaron durante 16 h a 0,1 mbar para proporcionar 3 como un polvo blanco.

35 Se determinó el contenido de grupo amino del hidrogel mediante el acoplamiento de aminoácido de fmoc a los grupos amino libres del hidrogel y la posterior determinación por fmoc según se describe en Gude, M., J. Ryf, et al. (2002) Letters in Peptide Science 9(4): 203-206.

Para los diferentes lotes, se determinó que el contenido de grupo amino de 3 estaba entre 0,11 y 0,16 mmol/g.

Ejemplo 4

Preparación de perlas de hidrogel funcionalizadas con maleimida (4) y determinación de la sustitución de maleimida



Mal-PEG6-NHS

40 Se prelavaron perlas de hidrogel 3 con 99/1 (v/v) DMSO/DIPEA, se lavaron con DMSO y se incubaron durante 45 min con una disolución de Mal-PEG6-NHS (2,0 eq. con respecto a la cantidad teórica de grupos amino en el hidrogel) en DMSO. Las perlas 4 se lavaron cinco veces con DMSO y cinco veces con succinato con pH 3,0 (20 mM, 1 mM de EDTA, 0,01 % de Tween-20). La muestra se lavó tres veces con fosfato sódico con pH 6,0 (50 mM, 50 mM

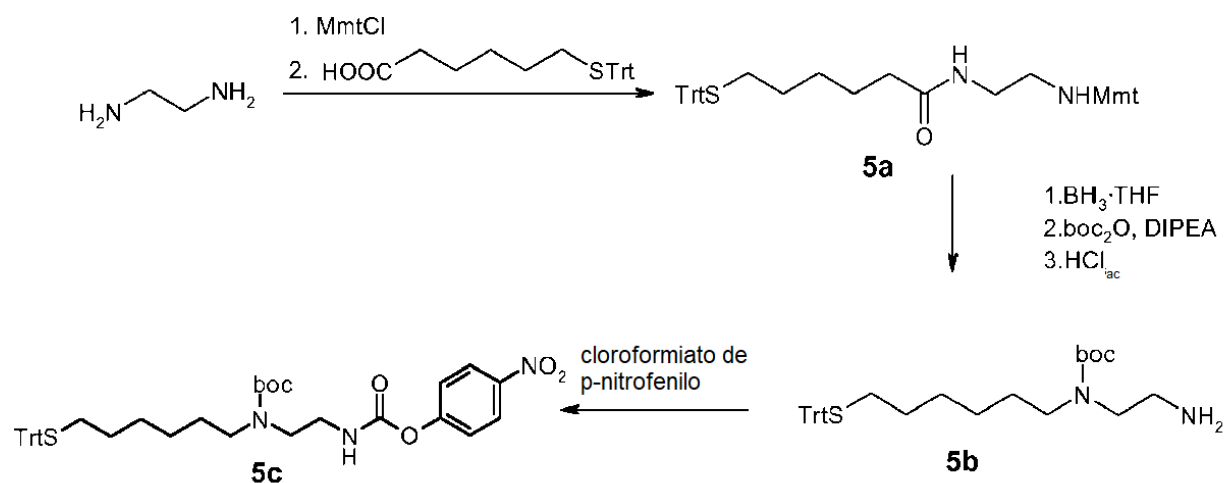
de etanolamina, 0,01 % de Tween-20) y se incubó en el mismo tampón durante 1 h a RT. A continuación, las perlas se lavaron cinco veces con succinato sódico con pH 3,0 (20 mM, 1 mM de EDTA, 0,01 % de Tween-20).

- 5 Para la determinación del contenido de maleimida, se lavó una alícuota de perlas de hidrogel 4 tres veces con agua y etanol cada vez. La muestra se liofilizó y se pesó. Se hizo reaccionar otra alícuota de perlas de hidrogel **4** con exceso de mercaptoetanol (en 50 mM de tampón de fosfato sódico, 30 min a RT) y se detectó el consumo de mercaptoetanol mediante la prueba de Ellman (Ellman, G. L. et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88-95). Se determinó que el contenido de maleimida estaba entre 0,10 y 0,13 mmol/g de hidrogel seco.

Ejemplo 5

Síntesis del reactivo enlazador 5c

- 10 El reactivo enlazador 5c se sintetizó según el siguiente esquema:



Síntesis del intermediario de reactivo enlazador 5a:

- 15 Se disolvió cloruro de m-metoxitritilo (3 g, 9,71 mmol) en DCM (20 mL) y se agregó por goteo a una disolución de etilendiamina (6,5 mL, 97,1 mmol) en DCM (20 mL). Después de dos horas, la disolución se vertió en éter dietílico (300 mL) y se lavó tres veces con 30/1 (v/v) salmuera/disolución 0,1 M NaOH (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se retiraron a presión reducida. El intermediario protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 20 El intermediario protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol) se disolvió en DCM anhidro (30 mL). Se agregaron ácido 6-(S-tritilmercapto)hexanoico (4,48 g, 11,47 mmol), PyBOP (5,67 g, 11,47 mmol) y DIPEA (5,0 mL, 28,68 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min a RT. La disolución se diluyó con éter dietílico (250 mL) y se lavó tres veces con 30/1 (v/v) salmuera/disolución 0,1 M NaOH (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se retiraron a presión reducida. 5a se purificó mediante cromatografía rápida.

Rendimiento: 5,69 g (8,09 mmol).

MS: m/z 705,4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (PM calculado = 705,0).

- 25 Síntesis del intermediario de reactivo enlazador 5b:

- 30 A una disolución de 5a (3,19 g, 4,53 mmol) en THF anhidro (50 mL) se agregó $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (disolución 1 M, 8,5 mL, 8,5 mmol) y la disolución se agitó durante 16 h a RT. Se agregó $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ adicional (disolución 1 M, 14 mL, 14 mmol) y se agitó durante 16 h a RT. La reacción se aplacó mediante la adición de metanol (8,5 mL). Se agregó *N,N*-dimetil-etilendiamina (3 mL, 27,2 mmol) y la disolución se calentó hasta reflujo y se agitó durante tres h. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y después se diluyó con acetato de etilo (300 mL), se lavó con disolución de Na_2CO_3 acuosa saturada (2 x 100 mL) y disolución de NaHCO_3 acuosa saturada (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se retiraron a presión reducida para obtener el intermediario de amina bruto (3,22 g).

- 35 El intermediario de amina (3,22 g) se disolvió en DCM (5 mL). Se agregaron Boc_2O (2,97 g, 13,69 mmol) disuelto en DCM (5 mL) y DIPEA (3,95 mL, 22,65 mmol) y la mezcla se agitó a RT durante 30 min. La mezcla se purificó mediante cromatografía rápida para obtener el intermediario protegido con Boc y Mmt bruto (3,00 g). MS: m/z 791,4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 519,3 = $[\text{M}-\text{Mmt}+\text{H}]^+$ (PM calculado = 791,1).

5 Se agregó 0,4 M HCl acuoso (48 mL) a una disolución del intermediario protegido con Boc y Mmt en acetonitrilo (45 mL). La mezcla se diluyó con acetonitrilo (10 mL) y se agitó durante 1 h a RT. Posteriormente, se ajustó el valor del pH de la mezcla de reacción hasta 5,5 mediante la adición de una disolución de 5 M NaOH. Se retiró el acetonitrilo a presión reducida y la disolución acuosa se extrajo con DCM (4 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y los volátiles se retiraron a presión reducida. 5b bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 2,52 g (3,19 mmol).

MS: m/z 519,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 519,8 g/mol).

Síntesis del reactivo enlazador 5c:

10 El intermediario 5b (985 mg, 1,9 mmol) y cloroformiato de p-nitrofenilo (330 mg, 2,5 mmol) se disolvieron en THF anhidro (10 mL). Se agregó DIPEA (0,653 mL, 3,7 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a RT. La disolución se acidificó mediante la adición de ácido acético (1 mL). 5c se purificó mediante RP-HPLC.

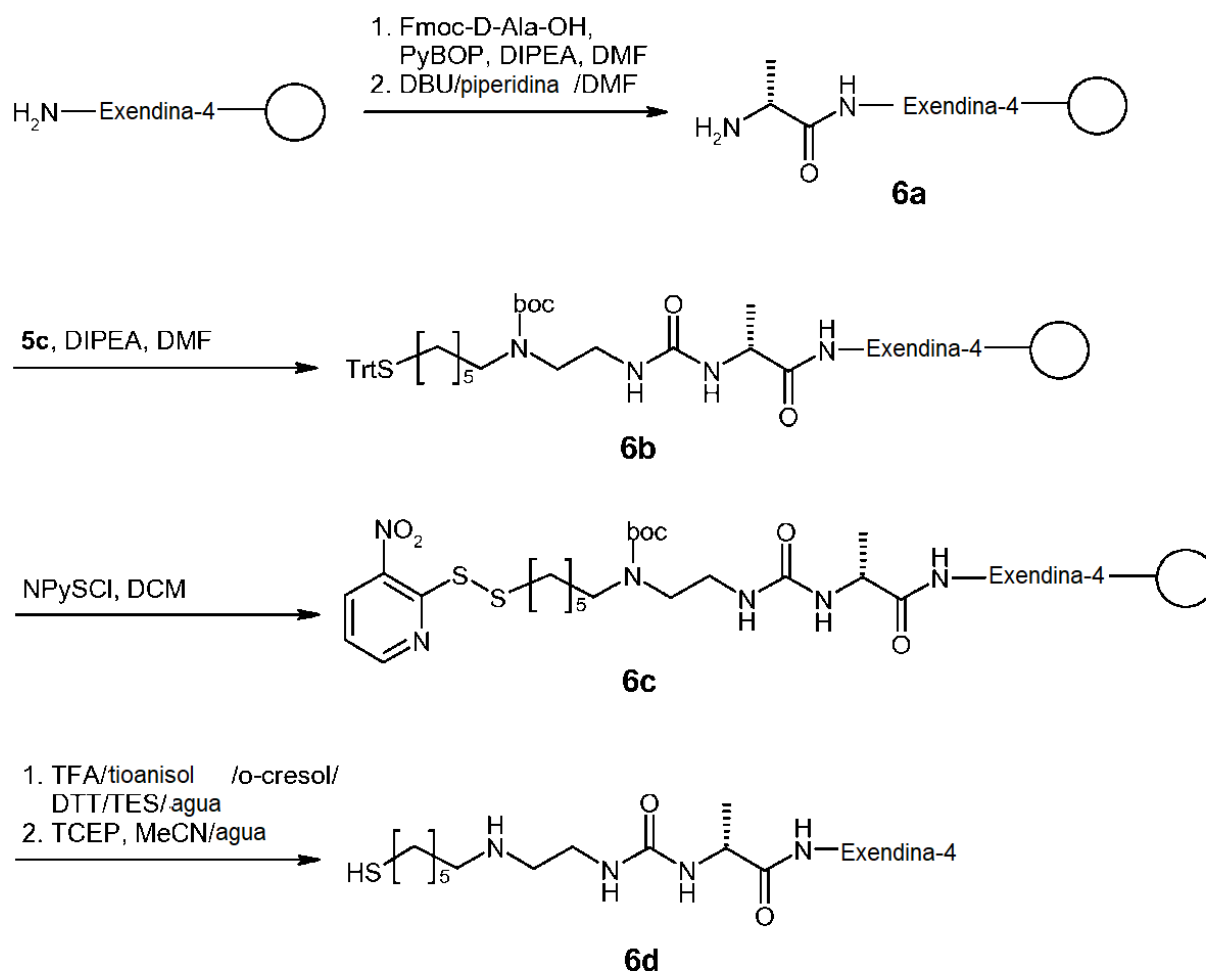
Rendimiento: 776 mg, (1,13 mmol).

MS m/z 706,3 = [M+Na]⁺ (PM calculado = 706,3).

Ejemplo 6

15 Síntesis del reactivo enlazador de exendina 6d

El reactivo enlazador de exendina 6d se sintetizó según el siguiente esquema:



Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de exendina 6a:

20 Se transfirió la exendina-4 con cadena lateral completamente protegida con extremo N libre sobre resina (2,00 g, 0,2 mmol, carga de aproximadamente 0,1 mmol/g) a una jeringa de 20 mL equipada con una frita de filtro. Se tomaron 8

mL de DMF anhidro con la jeringa y la jeringa se agitó (600 rpm) durante 15 min para prehinchar la resina. El disolvente se descartó, y se tomó una disolución de Fmoc-D-alanina-OH (187 mg, 0,6 %mol), PyBOP (312 mg, 0,6 mmol) y DIPEA (174 μ L, 1,0 mmol) en DMF anhidro (4 mL) con la jeringa. La jeringa se agitó a RT y 600 rpm durante 60 min. La disolución se descargó y la resina se lavó diez veces con DMF.

5 La desprotección por Fmoc se llevó a cabo según "Materiales y métodos".

Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de exendina 6b:

Se agregó una disolución de 5c (137 mg, 0,4 mmol) en DMF anhidro (3 mL) a la resina 6a (0,2 mmol), posteriormente una disolución de DIPEA (80 μ L, 0,46 mmol) en DMF anhidro (4,5 mL), y la mezcla de reacción se agitó (600 rpm) a 22 °C durante 15 horas.

10 La resina se lavó diez veces con DMF y diez veces con DCM y se secó al vacío.

Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de exendina 6c:

Se proporcionó cloruro de 3-nitro-2-piridina-sulfenilo (48 mg, 0,25 mmol) en una jeringa que contenía 6b (0,05 mmol, 0,5 g). Se tomó DCM anhidro (4 mL) con la jeringa y la mezcla se agitó (600 rpm) a RT. Después de 2 h, la disolución se descartó y la resina se lavó 14 veces con DCM y se secó al vacío.

15 Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de exendina 6d:

En un matraz de fondo redondo se disolvieron o-cresol (1,5 mL), tioanisol (1,5 mL), DTT (1,125 g), TES (1,125 mL) y agua (1,5 mL) en TFA (37,5 mL). Se agregó 6c (0,15 mmol, 1,5 g) a la disolución agitada (250-350 rpm) a RT para obtener una suspensión homogénea. Se continuó con la agitación durante 45 min. La disolución se separó de las perlas de resina mediante filtración, las perlas se lavaron con TFA dos veces (2 mL cada vez) y las disoluciones de lavado se combinaron con el filtrado. Se retiró el TFA de las disoluciones combinadas en una corriente de nitrógeno.

20 Se precipitó 6d bruto a partir de la disolución concentrada (aprox. 10 mL) mediante la adición de éter dietílico (30 mL) y agitación vigorosa. Después de la centrifugación (2 min, 5000 rpm), se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con éter dietílico dos veces (20 mL cada vez).

25 El precipitado seco se disolvió en una disolución de TCEP (114 mg, 0,39 mmol) en 30 ml de 1/19 (v/v) acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,01 % (v/v). La mezcla se incubó durante 15 horas a RT. Se purificó 6d mediante RP-HPLC según se describe en Materiales y Métodos usando una columna 150 x 30 mm Waters XBridge™ BEH300 C18 10 μ m y un flujo de 40 ml/min.

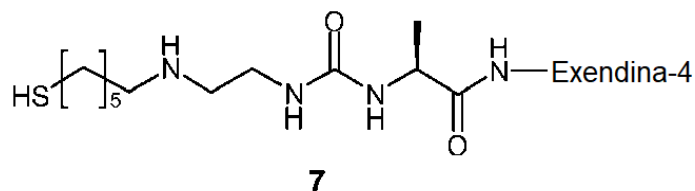
30 Se cargaron hasta 12 mL de la mezcla en la columna. La elución se llevó a cabo usando un gradiente lineal de 5 % a 30 % de disolvente B (5 min) y posteriormente un gradiente lineal de 30 % a 35 % de disolvente B (40 min). Las fracciones que contenían el producto 6d se concentraron y liofilizaron. Pureza: 86 % (215 nm)

Rendimiento: 85,2 mg (19,2 μ mol, a partir de 2,00 g de resina).

MS m/z 1486,7 = [M+3H]³⁺, (PM calculado = 4460,0 g/mol).

Ejemplo 7

Síntesis del reactivo enlazador de exendina comparativo 7



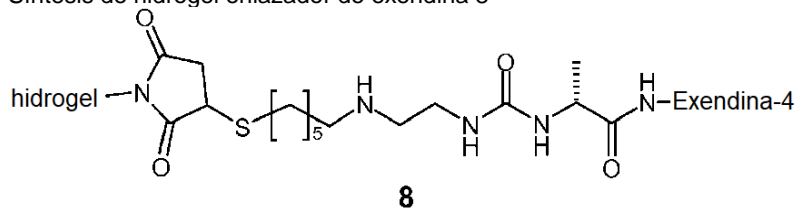
35 El reactivo enlazador de exendina **7** se sintetizó como se describe para el reactivo enlazador de exendina 6a-6d a partir de exendina-4 con cadena lateral completamente protegida sobre resina con extremo N libre (336 mg, 34 μ mol), excepto que se usó Fmoc-L-alanina-OH en lugar de Fmoc-D-alanina-OH. Los reactivos se ajustaron a escala en consecuencia para obtener las mismas relaciones que se usaron en 6a-6d.

40 Rendimiento: 13,4 mg

MS: m/z 1487,4 = [M+3H]³⁺, (PM calculado: 4460,0)

Ejemplo 8

Síntesis de hidrogel enlazador de exendina 8



Se cargaron 242,5 mg de hidrogel funcionalizado con maleimida 4 (25,0 μmol de grupos de maleimido), como suspensión en tampón de succinato con pH 3,0 (20 mM, 1 mM de EDTA, 0,01 % de Tween-20) en una jeringa equipada con una frita de filtro. El hidrogel se lavó diez veces con 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua que contenían TFA al 0,1 % (v/v). Se tomó una disolución de reactivo enlazador de exendina 6d (122,7 mg, 27,5 μmol) en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua más TFA al 0,1 % (3,7 mL) y se agitó durante 2 min a RT para obtener una suspensión equilibrada. Se agregaron 334 μL tampón de fosfato (pH 7,4, 0,5 M) y la jeringa se agitó (600 rpm) a RT durante 15 min. El consumo de tiol se monitorizó mediante la prueba de Ellman. El hidrogel se lavó 10 veces con 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua que contenían TFA al 0,1 % (v/v). Se disolvió mercaptoetanol (47 μL) en 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua más TFA al 0,1 % (3 mL) y tampón de fosfato (0,5 mL, pH 7,4, 0,5 M). Se tomó la disolución con la jeringa y la muestra se agitó (600 rpm) durante 1 h a RT. La disolución se descartó y el hidrogel se lavó diez veces con 1/1 (v/v) de acetonitrilo/agua más TFA al 0,1 %. Después de que el hidrogel se lavó diez veces con tampón de succinato (10 mM de succinato, 46 g/L de manitol, 0,05 % de Tween-20, se ajustó con Tris hasta pH 5,0) y se almacenó a 4 °C.

El contenido de exendina del hidrogel enlazador de exendina se determinó según Materiales y Métodos.

Se obtuvo un contenido de exendina de 30 % (peso).

Ejemplo 9

Cinética de liberación in vitro

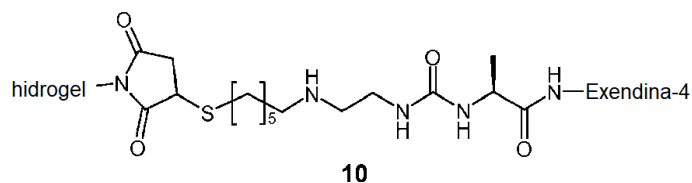
Se transfirió una alícuota del hidrogel enlazador de exendina 8 (0,5 mg de exendina) a una jeringa equipada con una frita de filtro y se lavó 5 veces con tampón de fosfato con pH 7,4 (60 mM, 3 mM de EDTA, 0,01 % de Tween-20). El hidrogel se suspendió en el mismo tampón y se incubó a 37 °C. En puntos de tiempo definidos (después de 1 - 7 días de incubación en cada tiempo) el sobrenadante se intercambiaba y se cuantificó la exendina liberada mediante RP-HPLC a 215 nm. Las señales de UV que se correlacionan con la exendina liberada se integraron y graficaron con respecto al tiempo de incubación.

Se aplicó un programa informático de ajuste de curva para estimar el tiempo medio de liberación correspondiente.

Se obtuvo un primer orden de cinética de liberación con una semivida de 45 d (véase la Figura 1).

Ejemplo 10

Síntesis del hidrogel enlazador de exendina comparativo 10

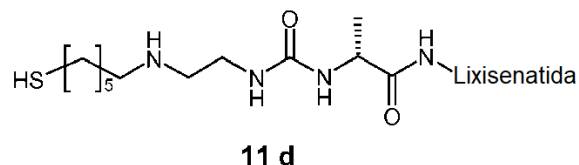


El hidrogel enlazador de exendina 10 se sintetizó según se describe para el hidrogel enlazador de exendina 8 excepto que se usó tiol enlazador de exendina 7 en lugar de tiol enlazador de exendina 6d.

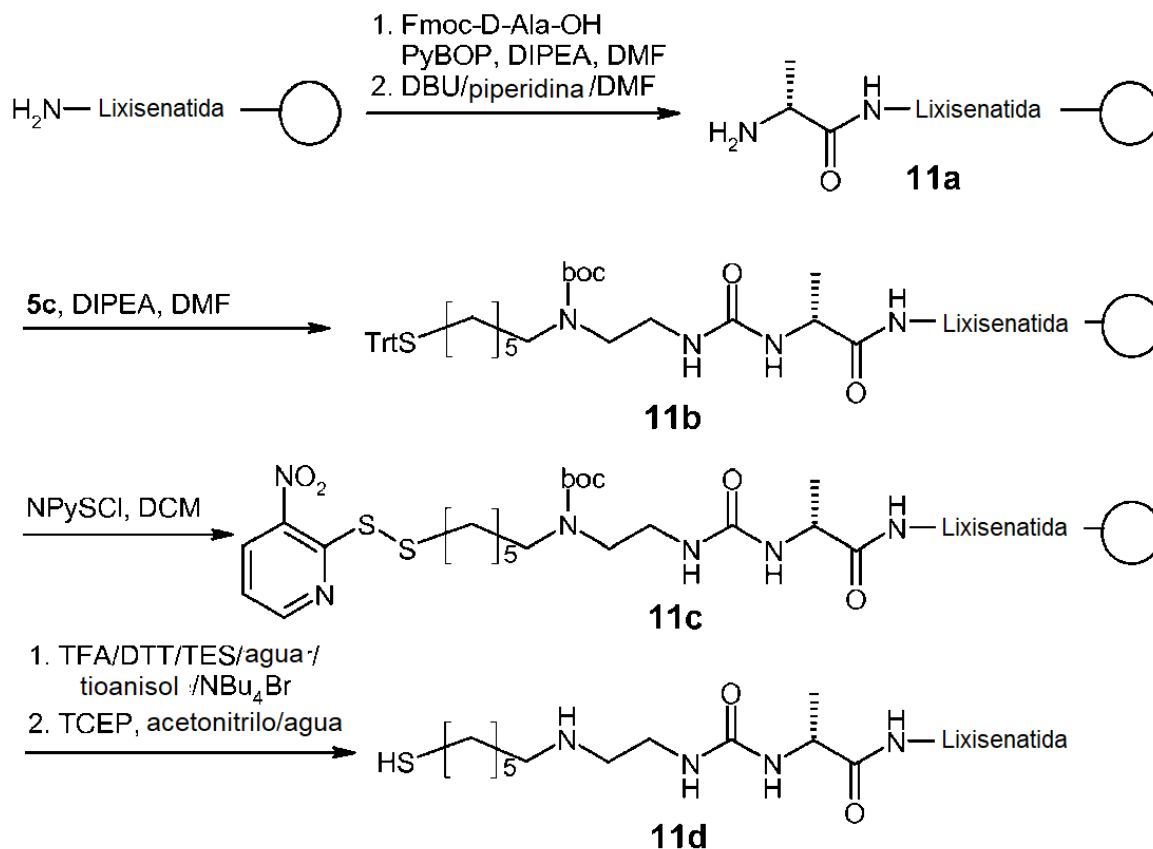
El contenido de exendina del hidrogel enlazador de exendina se determinó según Materiales y Métodos. Se obtuvo un contenido de exendina de 30,5 % (peso).

Ejemplo 11

Síntesis de reactivo enlazador de lixisenatida 11 d



Esquema de síntesis:



Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de lixisenatida 11a:

- 5 Se transfirió lixisenatida con cadena lateral completamente protegida sobre resina con extremo N libre (300 mg, carga de aproximadamente 0,1 mmol/g) a una jeringa de 5 mL equipada con una frita de filtro. Se tomaron 4 mL de DMF anhidro con la jeringa y la jeringa se agitó (600 rpm) durante 15 min para prehinchar la resina. El disolvente se descartó, y se tomó una disolución de Fmoc-D-alanina-OH (28 mg, 90 μ mol), PyBOP (47 mg, 90 μ mol) y DIPEA (26 μ L, 150 mmol) en DMF anhidro (2 mL) con la jeringa. La jeringa se agitó a RT y 600 rpm durante 60 min. La disolución se descargó y la resina se lavó diez veces con DMF.
- 10 La desprotección por Fmoc se llevó a cabo según "Materiales y métodos".

Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de lixisenatida 11b:

- Se agregó una disolución de 5c (41 mg, 60 μ mol) en DMF anhidro (1,5 mL) a la resina 11a (30 μ mol), posteriormente se agregó DIPEA (13 μ L, 75 μ mol) y la mezcla de reacción homogeneizada se agitó (600 rpm) a 22 °C durante 22 horas.
- 15 La resina se lavó diez veces con DMF y diez veces con DCM y se secó al vacío.

Síntesis del intermediario de reactivo enlazador de lixisenatida 11c:

- Se proporcionó cloruro de 3-nitro-2-piridina-sulfenilo (38 mg, 0,20 mmol) en una jeringa equipada con una frita de filtro que contenía 11b. Se tomó DCM anhidro (2 mL) con la jeringa y la mezcla se agitó (600 rpm) a RT. Después de 3,5 h, la disolución se descartó y la resina se lavó 15 veces con DCM y se secó al vacío.
- 20 Síntesis del reactivo enlazador de lixisenatida 11d:

En un tubo Falcon de 50 mL se disolvieron NBu₄Br (2,9 mg), tianisol (58,3 μ L), DTT (170 mg), TES (170 μ L) y agua (113,3 μ L) en TFA (5,83 mL). Se agregó 11c (30 μ mol) a la disolución agitada (200 rpm) a RT para obtener una suspensión homogénea. La agitación se continuó durante 1 h. Las perlas se retiraron por filtración y se lavaron con TFA dos veces (1 mL cada vez). Las disoluciones de lavado se combinaron con el filtrado.

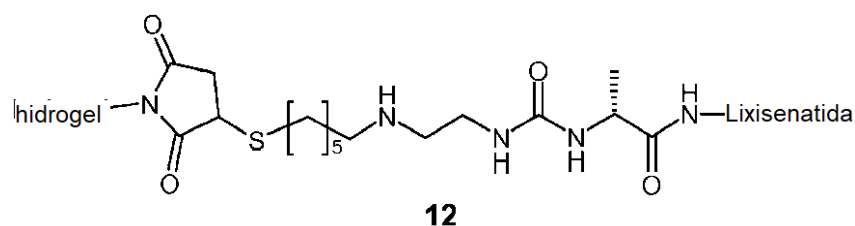
Se precipitó 11d bruto a partir del filtrado (aprox. 10 mL) mediante la adición de éter dietílico frío (-18 °C, 40 mL) y agitación vigorosa. La suspensión se enfrió a -18 °C durante 15 min adicionales y se centrifugó (2 min, 5000 rpm). El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con éter dietílico dos veces (20 mL cada vez) y se secó a presión reducida. El precipitado se disolvió en una disolución de TCEP (27 mg, 0,94 µmol) en 2,5 ml de 1/1 (v/v) acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,01 % (v/v). La mezcla se incubó durante 15 horas a RT. Se agregaron 20 mL de agua y 11d se purificó mediante RP-HPLC en dos pasadas usando un gradiente lineal de 5 % a 30 % de disolvente B (5 min) y posteriormente un gradiente lineal de 30 % a 35 % de disolvente B (40 min). Se usó una columna 150 x 30 mm Waters XBridge™ BEH300 C18 10 µm y un flujo de 40 ml/min. Las fracciones que contenían el producto 11d se concentraron y liofilizaron.

10 Rendimiento 6,1 mg

MS: m/z 1284,3 = [M+4H]⁴⁺ (PM calculado = 5131,9).

Ejemplo 12

Síntesis del hidrogel enlazador de lixisenatida 12

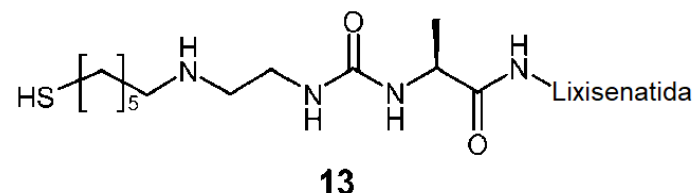


15 El hidrogel enlazador de lixisenatida 12 se sintetizó según se describe para el hidrogel enlazador de exendina 8 excepto que se usó tiol enlazador de lixisenatida **11d** en lugar de tiol enlazador de exendina 6d.

El contenido de lixisenatida del hidrogel enlazador de lixisenatida se determinó según Materiales y Métodos. Se obtuvo un contenido de lixisenatida de 32,4 %.

Ejemplo 13

20 Síntesis de reactivo enlazador de lixisenatida comparativo 13



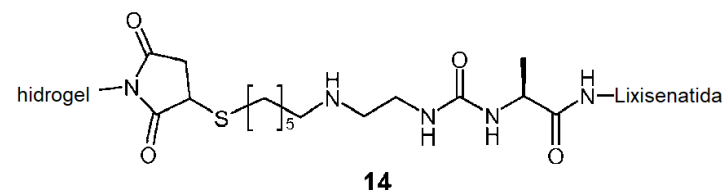
25 El reactivo enlazador de lixisenatida 13 se sintetizó como se describe para el reactivo enlazador de lixisenatida 11a-11d a partir de lixisenatida con cadena lateral completamente protegida sobre resina con extremo N libre (335 mg, 34 µmol), excepto que se usó Fmoc-L-alanina-OH en lugar de Fmoc-D-alanina-OH. Los reactivos se ajustaron a escala en consecuencia para obtener las mismas relaciones que se usaron en 11a-11d.

Rendimiento 7,3 mg

MS: m/z 1283,9 = [M+4H]⁴⁺ (PM calculado = 5131,9).

Ejemplo 14

Síntesis del hidrogel enlazador de lixisenatida comparativo 14

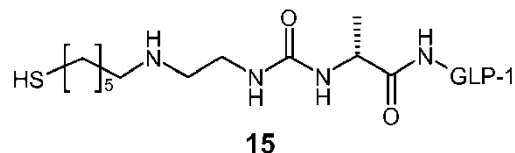


30

El hidrogel enlazador de lixisenatida 14 se sintetizó según se describe para el hidrogel enlazador de exendina 8 excepto que se usó tiol enlazador de lixisenatida 13 en lugar de tiol enlazador de exendina 6d.

El contenido de lixisenatida del hidrogel enlazador de lixisenatida se determinó según Materiales y Métodos. Se obtuvo un contenido de lixisenatida de 34,5 % (peso).

Síntesis de reactivo enlazador de GLP-1 15



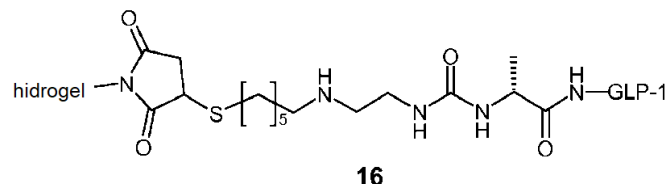
- 5 El reactivo enlazador de GLP-1 15 se sintetizó como se describe para el reactivo enlazador de lixisenatida 11a-11d excepto que se hizo a partir de GLP-1 con cadena lateral completamente protegida sobre resina con extremo N libre (258 mg, 30 μ mol) en lugar de exendina sobre resina. Los reactivos se ajustaron a escala en consecuencia para obtener las mismas relaciones que se usaron en 11a-11d.

Rendimiento 5,0 mg

- 10 MS: m/z 1191,4 = $[M+3H]^{3+}$ (PM calculado = 3571,1).

Ejemplo 16

Síntesis de hidrogel enlazador de GLP-1 16



- 15 El hidrogel enlazador de GLP-1 16 se sintetizó según se describe para el hidrogel enlazador de exendina 8 excepto que se usó tiol enlazador de GLP-1 15 en lugar de tiol enlazador de exendina 6d.

El contenido de GLP-1 del hidrogel enlazador de GLP-1 se determinó según Materiales y Métodos. Se obtuvo un contenido de GLP-1 de 26,3 % (peso).

Ejemplo 17

Cinética de liberación in vitro

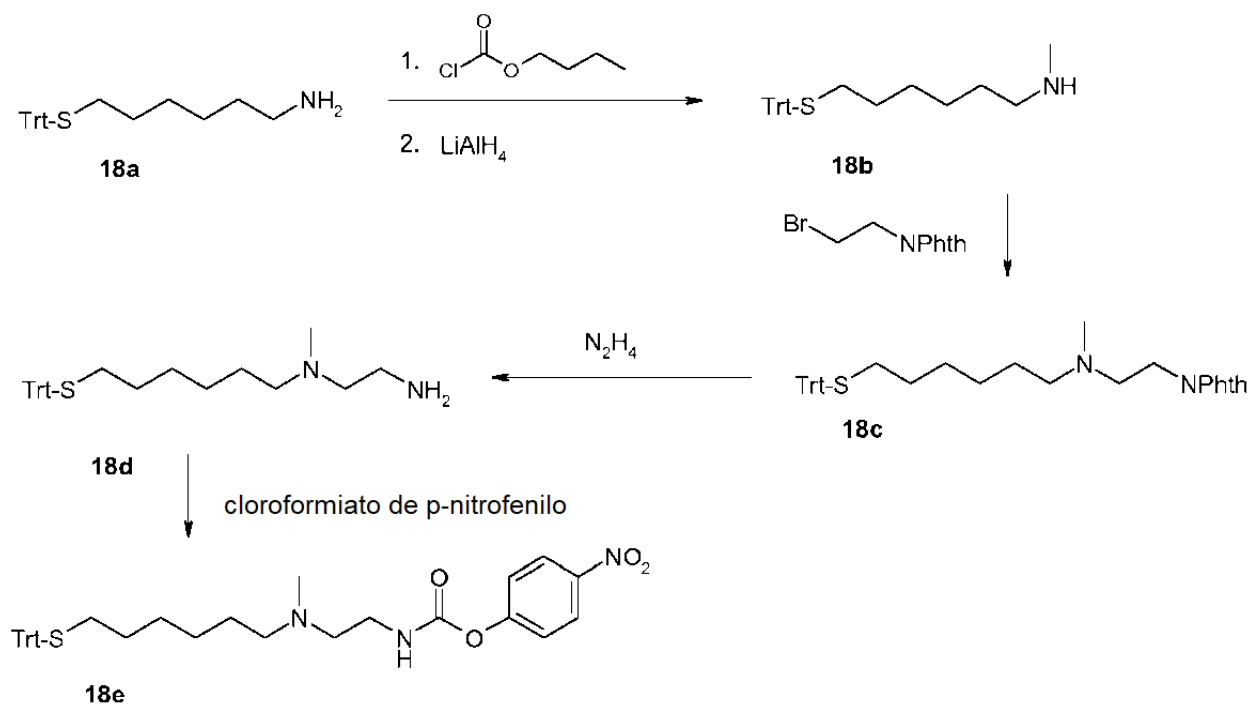
- 20 El tiempo de semivida de liberación a pH 7,4, 37 °C de exendina a partir del hidrogel 10, de lixisenatida a partir de los hidrogeles 12 y 14, y de GLP-1 a partir del hidrogel 16 se determinó según se describe en el Ejemplo 9. La cinética de liberación de los compuestos 8, 10, 12, 14 y 16 se muestra en la Figura 1.

Hidrogel	fármaco	configuración de Ala en la estructura del enlazador	tiempo de semivida
10	exendina	L	28 d
12	lixisenatida	D	43 d
14	lixisenatida	L	27 d
16	GLP-1	D	50 d
8	exendina	D	45 d

Ejemplo 18

Síntesis del reactivo enlazador 18e

- 25 El reactivo enlazador 18e se sintetizó según el siguiente esquema:



La síntesis del intermediario de reactivo enlazador 18b se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno. Se enfrió una disolución de amina 18a (1,69 g, 4,5 mmol, para la preparación véase la publicación internacional WO-A 2009/133137) en 30 mL de THF (seco, tamiz mol.) hasta 0 °C. se agregaron cloroformiato de butilo (630 µl, 4,95 mmol) en 3 mL de THF (seco, tamiz mol.) y DIPEA (980 µl, 5,63 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a 0 °C, se quitó el enfriamiento y la mezcla se agitó durante 20 min adicionales a RT. Se agregó 1 M LiAlH₄ en THF (9 mL, 9 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo durante 1,5 h. La reacción se aplacó al agregar lentamente metanol (11 mL) y 100 mL de disolución de Na/K tartrato sat. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto bruto 18b (1,97 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 390,2 = [M+H]⁺ (PM calculado = 389,6).

Una disolución del producto bruto 18b (1,97 g), N-(bromoetil)-ftalimida (1,43 g, 5,63 mmol) y K₂CO₃ (1,24 g, 9,0 mmol) en 120 mL de acetonitrilo se sometió a reflujo durante 6 h. Se agregaron 60 mL de una disolución de NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se retiró a presión reducida. Se purificó ftalimida 18c sobre sílice mediante el uso de heptano (que contenía NEt₃ al 0,02 %) y una cantidad creciente de acetato de etilo (que contenía NEt₃ al 0,02 %) como eluyentes.

Rendimiento: 0,82 g (1,46 mmol).

MS: m/z 563,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 562,8).

La ftalimida 18c (819 mg 1,46 mmol) se disolvió en 35 mL de etanol y se agregó hidrato de hidrazina (176 µl, 3,64 mmol). La mezcla se sometió a reflujo durante 3 h. El precipitado se retiró por filtración. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se trató con 15 mL de diclorometano. El precipitado se retiró por filtración y el diclorometano se retiró a presión reducida. El residuo se purificó mediante RP-HPLC. Las fracciones de HPLC concentradas se ajustaron hasta pH 7 mediante la adición de NaHCO₃ y se extrajeron varias veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar la amina 18d.

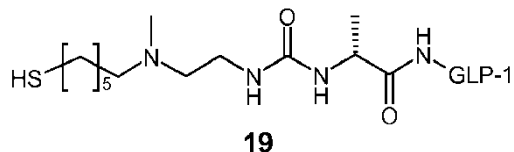
Rendimiento: 579 mg (1,34 mmol).

MS: m/z 433,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 432,7).

Se disolvió cloroformiato de para-nitrofenil (483 mg, 2,40 mmol) en 10 mL de diclorometano (seco, tamiz mol.). Se agregaron una disolución de amina 18d (1,00 g, 2,31 mmol) en 5 mL de diclorometano (seco, tamiz mol.) y 1,8 mL de sim-colidina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Se retiró el diclorometano a presión reducida, el residuo se acidificó con ácido acético y se purificó mediante RP-HPLC para proporcionar carbamato de para-nitrofenilo 18e.

Rendimiento: 339 mg (0,57 mmol). MS: m/z 598,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 597,8).

Síntesis de reactivo enlazador de GLP-1 19



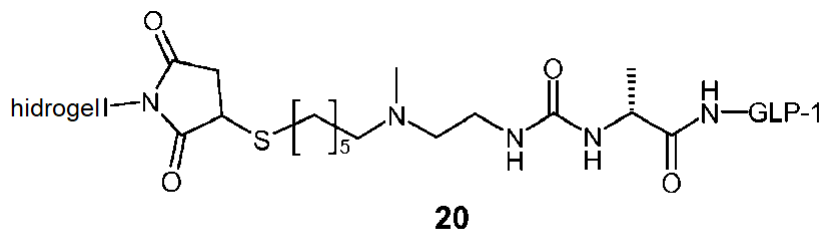
5 El reactivo enlazador de GLP-1 19 se sintetizó como se describe para el reactivo enlazador de GLP-1 15 excepto que se usó el reactivo enlazador 18e en lugar del reactivo enlazador 5c, a partir de GLP-1 con cadena lateral completamente protegida sobre resina con extremo N libre (150 mg, 16,5 μmol). Los reactivos se ajustaron a escala en consecuencia para obtener las mismas relaciones que se usaron en 11a-11d.

Rendimiento 1,33 mg

MS: m/z 1196,0 = $[M+3H]^{3+}$ (PM calculado = 3585,1).

Ejemplo 20

10 Síntesis de hidrogel enlazador de GLP-1 20



El hidrogel enlazador de GLP-1 20 se sintetizó según se describe para el hidrogel enlazador de exendina 8 excepto que se usó tior enlazador de GLP-1 19 en lugar de tior enlazador de exendina 6d.

Abreviaturas:

- 15 AcOH
ácido acético
AcOEt
acetato de etilo
Bn
20 bencilo
Boc
t-butiloxicarbonilo
DBU
1,3-diazabicyclo[5.4.0]undeceno
25 DCC
N,N-diciclohexilcarbodiimida
DCM
diclorometano
DIPEA
30 diisopropiletilamina
DMAP

- dimetilamino-piridina
- DMF
- N,N-dimetilformamida
- DMSO
- 5 dimetilsulfóxido
- DTT
- DL ditiotreitól
- EDC
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- 10 EDTA
- ácido etilendiaminatetraacético
- eq
- equivalente estequiométrico
- EtOH
- 15 etanol
- Fmoc
- 9-fluorenilmetoxicarbonilo
- HPLC
- cromatografía líquida de alto rendimiento
- 20 HOBt
- N-hidroxibenzotriazol
- iPrOH
- 2-propanol
- LCMS
- 25 cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
- Mal
- 3-maleimido propilo
- Mal-PEG6-NHS
- Éster NHS de ácido N-(3-maleimidopropil)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoico
- 30 Me
- metilo
- MeOH
- metanol
- Mmt
- 35 4-metoxitritilo
- MS

- espectro de masas / espectrometría de masas
- MTBE
- metil *terc.*-butil éter
- PM
- 5 masa molecular
- NHS
- N-hidroxi succinimida
- PEG
- poli(etilenglicol)
- 10 PyBOP
- hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
- Phth
- ftalimido
- RP-HPLC
- 15 Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
- rpm
- revoluciones por minuto
- RT
- temperatura ambiente
- 20 SEC
- cromatografía de exclusión por tamaño
- TCEP
- clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina
- TES
- 25 trietilsilano
- TFA
- ácido trifluoroacético
- THF
- tetrahidrofurano
- 30 TMEDA
- N,N,N'-tetrametiletileno diamina
- Tris
- tris(hidroximetil)-aminometano
- Trt
- 35 trifenilmetilo, tritilo
- UPLC

cromatografía líquida de alto rendimiento

V

volumen

5 Listado de secuencias

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Profármacos que comprenden un conjugado de exendina enlazador

<130> DE2010/304S

<160> 21

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 39

< 212> PRT

< 213> artificial

15

<220>

< 223> Heloderma suspectum

20

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (39)..(39)

< 223> AMIDACIÓN

<400> 1

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

25

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

< 211> 39

< 212> PRT

< 213> Heloderma horridum

30

<220>

< 221> MOD_RES

< 222> (39)..(39)

< 223> AMIDACIÓN

35

<400> 2

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

ES 2 733 734 T3

<210> 3
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 5
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 <400> 3
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro
 20 25 30
 10
 <210> 4
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 15
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 <400> 4
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Tyr
 20 25 30
 20
 <210> 5
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 25
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 <400> 5
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
 20 25 30
 30
 <210> 6
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 35
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN
 40
 <400> 6
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
 20 25 30
 45
 <210> 7
 < 211> 28

ES 2 733 734 T3

< 212> PRT
 < 213> artificial

 <220>
 5 < 223> Exendina/Agonista de exendina

 <220>
 10 < 221> MOD_RES
 < 222> (28)..(28)
 < 223> AMIDACIÓN

 <400> 7
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
 20 25
 15

 <210> 8
 < 211> 39
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 20

 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

 <220>
 25 < 221> MOD_RES
 < 222> (39)..(39)
 < 223> AMIDACIÓN

 <400> 8
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 30

 <210> 9
 < 211> 28
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 35

 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

 <220>
 40 < 221> MOD_RES
 < 222> (28)..(28)
 < 223> AMIDACIÓN

 <400> 9
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn
 20 25
 <210> 10
 < 211> 28
 < 212> PRT

ES 2 733 734 T3

< 213> artificial
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 5
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (28)..(28)
 < 223> AMIDACIÓN
 10
 <400> 10
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Ala Ile Glu Phe Leu Lys Asn
 20 25
 <210> 11
 < 211> 39
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 15
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 20
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (39)..(39)
 < 223> AMIDACIÓN
 25
 <400> 11
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 12
 < 211> 39
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 30
 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina
 35
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (39)..(39)
 < 223> AMIDACIÓN
 40
 <400> 12
 His Gly Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 45

ES 2 733 734 T3

5
 <210> 13
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> GLP-1(7-37)
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN

10
 <400> 13
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

15

20
 <210> 14
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

25
 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN

<400> 14
 His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

30

35
 <210> 15
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> GLP-1(7-37)

<400> 15
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

40

45
 <210> 16
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

50
 <220>
 < 221> VARIANTE

ES 2 733 734 T3

< 222> (3)..(3)
 < 223> Pro, Phe o Tyr

<220>
 5 < 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN
 <400> 16
 His Ala Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 10 20 25 30

<210> 17
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

15 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

20 <220>
 < 221> VARIANTE
 < 222> (2)..(2)
 < 223> Tyr, ácido alfa aminobutírico (Abu), Val, D-Ala o Gly

25 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN
 <400> 17
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 30 20 25 30

<210> 18
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

35 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

<400> 18
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly
 40 20 25 30

<210> 19
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> artificial

45 <220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

50 <220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (1)..(1)
 < 223> Modificación: acetilo, piroglutamilo, N-2-hidroibenzoilo, N-trans-3-hexenoilo

55 <220>

ES 2 733 734 T3

< 221> MOD_RES
 < 222> (30)..(30)
 < 223> AMIDACIÓN

5

<400> 19
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 20
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> artificial

10

<220>
 < 223> Exendina/Agonista de exendina

15

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (2)..(2)
 < 223> Xaa: 6-amino-hexanoilo

20

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (31)..(31)
 < 223> AMIDACIÓN

25

<400> 20
 His Xaa Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 21
 < 211> 44
 < 212> PRT
 < 213> artificial

30

<220>
 < 223> Lixisenatida

35

<220>
 < 221> MOD_RES
 < 222> (44)..(44)
 < 223> AMIDACIÓN

40

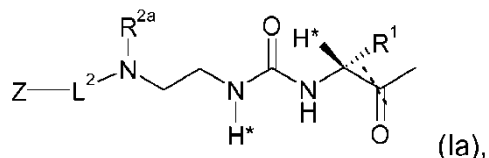
<400> 21
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

45

REIVINDICACIONES

1. Un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable de este que comprende un conjugado de exendina enlazador D-L, en donde D representa un resto exendina; y -L se representa mediante la fórmula (Ia),



5 en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₄;

R^{2a} se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,

en donde

10 L² es una unión química simple o un espaciador; y

Z es un hidrogel;

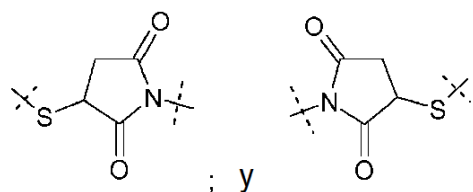
en donde el hidrogel es una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de captar grandes cantidades de agua, compuesta por homopolímeros o copolímeros, que son insolubles debido a la presencia de retículos químicos o físicos covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, entrelazamientos);

15 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida.

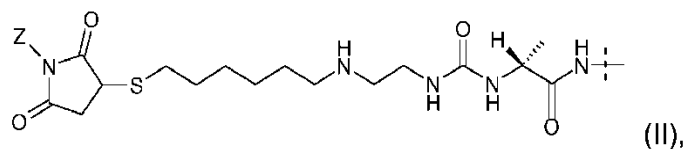
2. El profármaco de la reivindicación 1, en donde R¹ es -CH₃.

20 3. El profármaco de la reivindicación 1 o 2, en donde L² es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que se interrumpe opcionalmente mediante uno o más grupos seleccionados independientemente de -O-; y C(O)N(R3aa); opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de OH; y C(O)N(R3aaR3aaa); y en donde R3aa, R3aaa se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄.

25 4. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde L² se acopla a Z a través de un grupo terminal seleccionado de



5. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde L se representa mediante la fórmula (II)

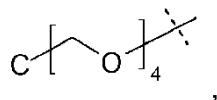


en donde la línea punteada indica el acoplamiento al nitrógeno de la exendina al formar una unión amida y

30 Z es un hidrogel.

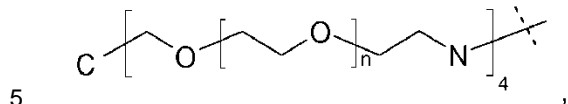
6. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el hidrogel es un hidrogel basado en PEG que comprende restos de cadena principal.

7. El profármaco de la reivindicación 6, en donde los restos de cadena principal comprenden un núcleo ramificante de la siguiente fórmula:



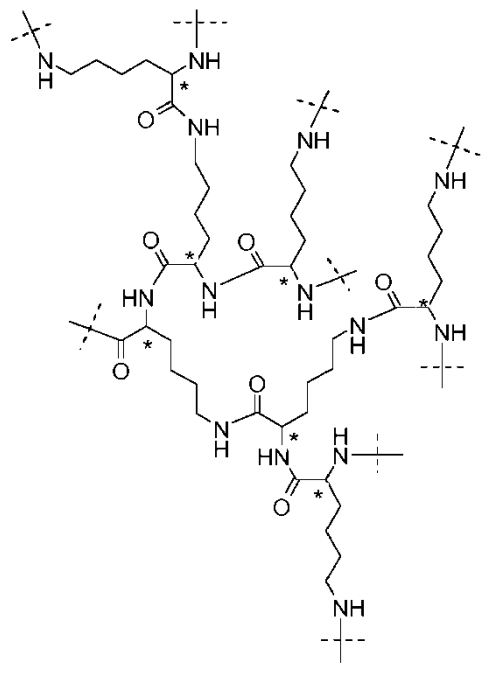
en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante del resto de cadena principal.

8. El profármaco de la reivindicación 6, en donde los restos de cadena principal comprenden una estructura con la siguiente fórmula:



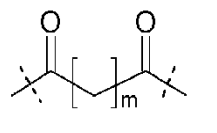
en donde n es un número entero de 5 a 50 y la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula.

9. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp con la siguiente fórmula:



10 en donde la línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula; y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

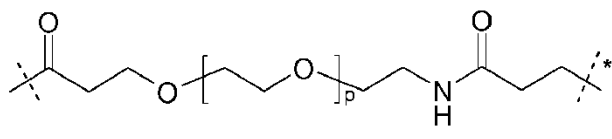
10. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde los restos de cadena principal comprenden al menos un espaciador con la siguiente fórmula:



15 en donde una de las líneas punteadas indica el acoplamiento con el resto hiperramificado Hyp y la segunda línea punteada indica el acoplamiento con lo restante de la molécula; y

en donde m es un número entero de 2 a 4.

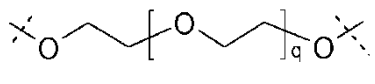
11. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde los restos de cadena principal comprenden al menos un espaciador con la siguiente fórmula:



en donde la línea punteada marcada con el asterisco indica la unión entre el hidrogel y el N del grupo tiosuccinimida de la reivindicación 5;

en donde la otra línea punteada indica el acoplamiento con Hyp; y en donde p es un número entero de 0 a 10.

- 5 12. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde los restos de cadena principal están enlazados entre sí a través de restos reticuladores que comprenden la siguiente estructura



en donde q es un número entero de 3 a 100.

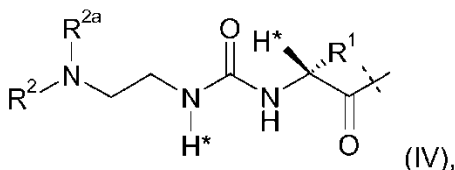
- 10 13. Una composición farmacéutica que comprende un profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una sal farmacéutica de esta junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso como un medicamento.

15. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar con exendina.

- 15 16. Un reactivo exendina-enlazador D-L*, en donde D representa un resto exendina; y

-L* es un reactivo enlazador no biológicamente activo representado por la fórmula (IV),



en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

- 20 R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₄;

R², R^{2a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,

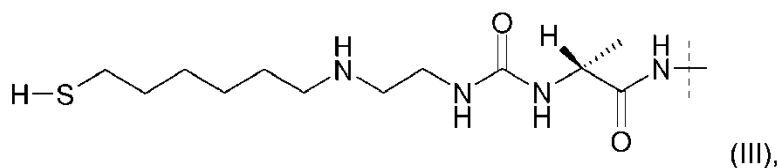
en donde L* se sustituye con una L^{2*} y en donde L^{2*} no se sustituye adicionalmente, siempre que los hidrógenos marcados con los asteriscos en la fórmula (IV) no se reemplacen con un sustituyente y en donde

- 25 L^{2*} es un espaciador conectado con L* y que comprende un grupo químico funcional previsto para la conjugación con un hidrogel;

en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendida, un análogo de exendina extendida, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida; y

- 30 en donde el grupo químico funcional se selecciona de ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol y derivados, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácido fosfónico y derivados, haloacetilo, haluros de alquilo, acrililo y otros aceptores de Michael alfa-beta insaturados, agentes arilantes como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros como disulfuro de piridilo, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos de
35 diazoacetilo, oxirano y aziridina.

17. Un intermediario de conjugado de exendina-enlazador D-L', en donde L' es de fórmula (III)



en donde la línea punteada indica el acoplamiento a uno de los grupos amino de la exendina al formar una unión amida;

D representa una exendina y

- 5 en donde la exendina es un agonista de exendina, un análogo de exendina, una exendina truncada, un agonista de exendina truncado, un análogo de exendina truncado, una exendina extendida, un agonista de exendina extendido, un análogo de exendina extendido, GLP-1, un análogo de GLP-1, tal como GLP-1 o análogo de GLP-1 en forma amidada, truncada o extendida.
- 10 18. Un proceso para la preparación de un profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas de
- (a) poner en contacto a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8 una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida con una disolución que comprende el reactivo de exendina-enlazador de la reivindicación 16, en donde el grupo químico funcional de L^{2*} comprende un grupo tiol, que resulta en un conjugado de exendina-enlazador-hidrogel;
- 15 (b) opcionalmente, tratar el conjugado de exendina-enlazador-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene tiol de 34 Da a 500 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8.
19. Un proceso para la preparación de un profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas de
- 20 (a) poner en contacto a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8 una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol con una disolución que comprende el reactivo de exendina-enlazador de la reivindicación 16, en donde el grupo químico funcional de L^{2*} comprende un grupo maleimida, que resulta en un conjugado de exendina-enlazador-hidrogel;
- 25 (b) opcionalmente, tratar el conjugado de exendina-enlazador-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene maleimida de 100 a 300 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4 °C en una disolución acuosa tamponada de pH 5,5-8.
20. Un proceso para preparar un profármaco inyectable por aguja que comprende la etapa de
- (a) preparar un profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en forma de micropartículas;
- (b) tamizar las micropartículas
- 30 (c) seleccionar una fracción con un diámetro de perla de profármaco de entre 25 y 80 µm.
- (d) suspender la fracción de perla de la etapa (c) en una disolución de tampón acuosa adecuada para inyección.

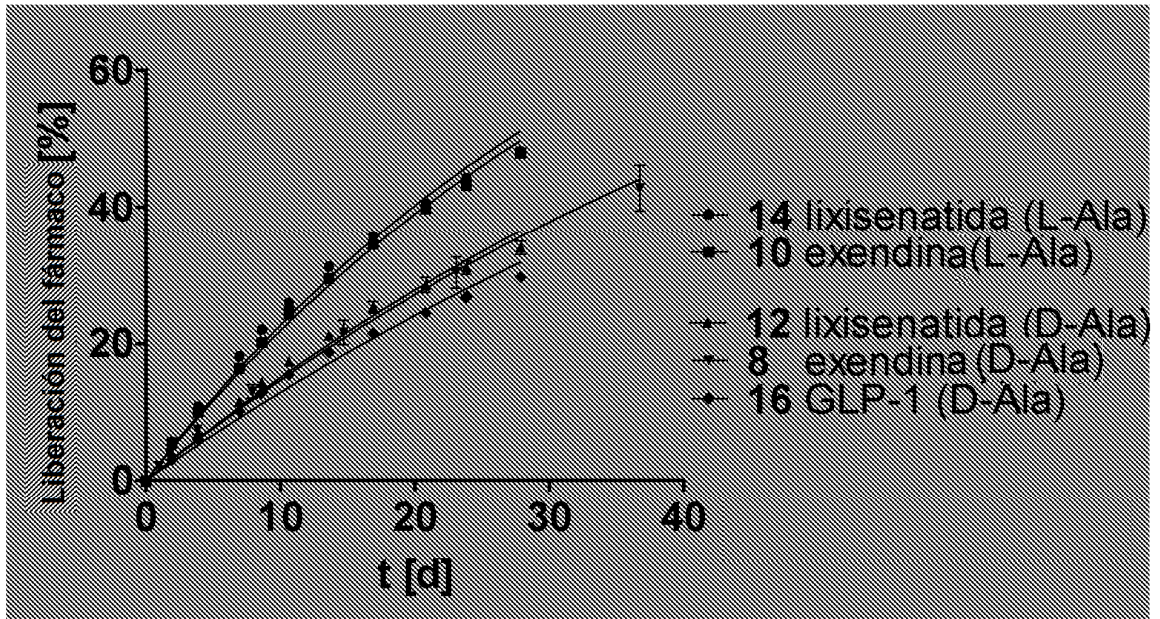


Fig. 1