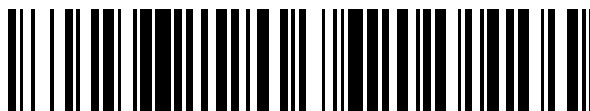


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 752**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/61 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2016 PCT/EP2016/062496**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016 E 16727469 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3302567**

54 Título: **Profármacos que comprenden un conjugado de enlazador de agonista dual de GLP-1/Glucagón y ácido hialurónico**

30 Prioridad:

05.06.2015 EP 15305858

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**KADEREIT, DIETER;
WAGNER, MICHAEL;
OLPP, THOMAS;
MEYER, NINO;
DHAL, PRADEEP;
KONOWICZ, PAUL;
MILLER, ROBERT;
STEFANO, JAMES;
BESEV, MAGNUS;
BOSSART, MARTIN;
LORENZ, KATRIN;
HAACK, TORSTEN y
EVERS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 759 752 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 de enlazador de agonista dual de GLP-1/Glucagón y ácido hialurónico.

5 La presente invención se refiere a profármacos agonistas duales de GLP-1/Glucagón, a composiciones farmacéuticas que comprende dichos profármacos, además de su uso como medicamento para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar con un agonista dual de GLP-1/Glucagón, por ejemplo en el tratamiento de trastornos del síndrome metabólico, incluyendo diabetes y obesidad, además de reducción del exceso de ingesta de alimentos.

Antecedentes de la invención

Agonistas de GLP-1

10 La exendina-4 es un péptido de 39 aminoácidos, aislado de las secreciones salivales del monstruo de Gila venenoso (*Heloderma suspectum*). Posee una similitud de secuencia con varios miembros de la familia de péptidos del tipo glucagón, en donde la mayor homología de 53% es con el péptido 1 de tipo glucagón [7-36]-amida (GLP-1). La exendina-4 actúa como un agonista en el receptor GLP-1 y porta acción de secretagogo de insulina de tipo GLP-1 en islotes de ratas aislados. La exendina-4 es un agonista de gran potencia y el agonista de GLP-1 truncado-(9-39)-
15 amida es un antagonista en el receptor del péptido de tipo glucagón 1-(7-36)-amida de células beta segregadoras de insulina. (ver, p. ej., *J. Biol. Chem.* 268(26):19650-19655). La exendina-4 ("exenatida") fue aprobada recientemente en los EE. UU. y en la UE para mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes de tipo 2 que toman metformina y/o una sulfonilurea pero que no han logrado un control glucémico adecuado.

La secuencia de aminoácidos de exendina-4 se muestra como SEQ ID NO: 1

20 HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS-NH₂

La secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-36)-amida se muestra como SEQ ID NO 2

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR-NH₂

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que es liberado en el torrente sanguíneo cuando hay poca glucosa circulante. La secuencia de aminoácidos del glucagón se muestra en la SEQ ID NO 3.

25 HSQGTFTSDYSKYLDLRRRAQDFVQWLMNT-OH

Durante la hipoglucemia, cuando los niveles de glucosa en sangre caen debajo de lo normal, el glucagón le indica al hígado que debe descomponer glucógeno y liberar glucosa, causando un incremento en los niveles de glucosa en sangre hasta alcanzar un nivel normal. La hipoglucemia es un efecto colateral común de los pacientes tratados con insulina con hiperglucemia (niveles elevados de glucosa en sangre) debido a diabetes. Por consiguiente, la función
30 más predominante del glucagón en la regulación de la glucosa consiste en contrarrestar la acción de la insulina y mantener los niveles de glucosa en sangre.

Holst (Holst, J. J. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 1409) y Meier (Meier, J. J. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012, 8, 728) describen que los agonistas del receptor de GLP-1, como GLP-1, liraglutida y exendina-4, tienen 3 actividades farmacológicas importantes que mejoran el control glucémico en pacientes con T2DM, reduciendo la glucosa en ayunas y postprandial (FPG y PPG): (i) aumento de la segregación de insulina dependiente de glucosa (primera y segunda
35 fases mejoradas), (ii) actividad supresora de glucagón bajo condiciones hiperglucémicas, (iii) demora de la tasa de vaciamiento gástrico que resulta en la absorción retardada de la glucosa derivada de las comidas.

Agonistas de GLP-1/Glucagón (Glc)

40 Poci et al (*Obesity.* 2012; 20:1566-1571; *Diabetes* 2009, 58, 2258) y Day et al. (*Nat Chem Biol* 2009; 5:749) describen que la activación dual de los receptores de GLP-1 y glucagón, p. ej., combinando las acciones de GLP-1 y glucagón en una molécula, conduce a un principio terapéutico con acción antidiabética y un pronunciado efecto de reducción de peso.

Los péptidos que se unen y activan los receptores de glucagón y GLP-1 (Hjort et al. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30121-30124, 1994; Day JW et al, *Nature Chem Biol*, 5: 749-757, 2009) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimentos se describen en las solicitudes de patentes WO 2008/071972, WO 2008/101017,
45 WO 2009/155258, WO 2010/096052, WO 2010/096142, WO 2011/075393, WO 2008/152403, WO 2010/070251, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2011/160630, WO 2011/006497, WO 2011/152181, WO 2011/152182, WO2011/117415, WO2011/117416 y WO 2006/134340.

A su vez, los péptidos co-agonistas triples que no solamente activan el receptor de GLP-1 y de glucagón, sino también el receptor de GIP (polipéptido inhibidor gástrico) se describen en la publicación internacional WO 2012/088116 y por VA Gault et al (*Biochem Pharmacol*, 85, 16655-16662, 2013; *Diabetología*, 56, 1417-1424, 2013).

Bloom et al. (WO 2006/134340) describen que los péptidos que se unen y activan tanto el receptor de glucagón como de GLP-1 se pueden construir como moléculas híbridas de glucagón y exendina-4, en donde la parte N-terminal (p. ej., residuos 1-14 o 1-24) se origina a partir de glucagón y la parte C-terminal (p. ej., residuos 15-39 o 25-39) se origina a partir de exendina-4.

- 5 Otzen et al (Biochemistry, 45, 14503-14512, 2006) describen que los parches hidrófobos N- y C-terminales están implicados en la fibrilación de glucagón, debido a la hidrofobicidad y/o la gran propensión de las láminas β de los residuos subyacentes.

La publicación internacional WO2014/056872 describe péptidos que se unen y activan tanto el receptor de glucagón como de GLP-1 que derivan de exendina-4, en donde por lo menos un aminoácido en la posición 14 porta una cadena lateral para una semivida prolongada.

10 Los péptidos utilizados en la presente invención son análogos del péptido de exendina-4 que comprenden leucina en la posición 10 y glutamina en la posición 13, y se describen en las publicaciones internacionales WO2015/086731, WO2015/086732, WO2015/086733.

15 Los péptidos también utilizados en la presente invención también son análogos del péptido de exendina-4 que comprende beta-alanina en la posición 28 y se describen en la publicación internacional WO 2016/198604.

Asimismo, un péptido que se emplea en la presente invención que es análogo del péptido de exendina-4 comprende glutamina en la posición 3, beta-alanina en la posición 28 y D-alanina en las posiciones 29 y 34.

20 Los péptidos utilizados en la presente invención preferiblemente son solubles no solamente a pH neutro, sino también a pH 4,5. Además, la estabilidad química a valores de pH de 4,5 a 5 es un criterio importante para el producto de profármaco a largo plazo. El profármaco se formula preferiblemente en este intervalo de pH con el fin de obtener una semivida de por lo menos 6 meses a 4°C.

Agonistas de GLP-1/Glucagón de acción prolongada

25 Idealmente, el péptido se formula en un modo que proporciona un nivel en plasma sostenido en seres humanos durante por lo menos una semana después de la aplicación a un cuerpo humano, dando como resultado una frecuencia de inyección de una vez por semana o más.

La terapia actual con agonistas de GLP-1 de acción prolongada es Bydureon® que es exendina-4 en una suspensión de depósito para inyectar una vez por semana a base de ácido poli(glicol-co láctico) usando una aguja de gauge 23.

30 La publicación internacional WO2012/173422 describe un agonista de GLP-1/Glucagón conjugado a la región Fc de una inmunoglobulina para la administración semanal, en donde el péptido deriva de oxintomodulina.

Profármacos enlazados a vehículos

35 Para potenciar las propiedades físico-químicas o de farmacocinética de un fármaco *in vivo*, tal como su semivida, dicho fármaco se puede conjugar con un vehículo. Si el fármaco está transitoriamente unido a un vehículo y/o a un enlazador, dichos sistemas comúnmente se designan como profármacos enlazados a vehículos. Según las definiciones provistas por IUPAC (según lo expuesto en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac.medchem>, consultada el 22 de julio de 2009), un profármaco enlazado a vehículos es un profármaco que contiene un enlace temporal de una sustancia activa determinada con un grupo de vehículos transitorios que produce mejores propiedades físico-químicas o de farmacocinética y que se puede eliminar fácilmente *in vivo*, usualmente por escisión hidrolítica.

40 Los enlazadores empleados en dichos profármacos enlazados a vehículos pueden ser transitorios, lo que significa que son hidrolítica y no enzimáticamente degradables (escindibles) bajo condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas que oscilan entre, por ejemplo, una hora a tres meses. Los vehículos adecuados son polímeros y pueden o bien conjugarse directamente al enlazador o mediante un espaciador no escindible.

45 La conjugación de polímero transitoria a través de enlazadores de profármacos que no dejan rastros combina las ventajas del tiempo de residencia prolongado debido a la sujeción del polímero y la recuperación de la farmacología original del péptido natural después de la liberación del conjugado de polímero.

50 Usando los conjugados de enlazador de péptido y polímero, el péptido natural inalterado se libera lentamente después de la aplicación al paciente, guiado solamente por la cinética de liberación del enlazador y la farmacocinética del vehículo polimérico. Idealmente, la cinética de liberación sería independiente de la presencia de enzimas como proteasas o esterases en fluidos corporales para garantizar un patrón de liberación uniforme y homogéneo.

Las publicaciones internacionales WO2008/148839, WO2009/095479 y WO2012/035139 se refieren a profármacos que comprenden conjugados de enlazadores a fármacos, en donde el enlazador se une en forma covalente mediante un vínculo escindible a un resto biológicamente activo, tal como el agonista de GLP 1, exendina-4. El resto

biológicamente activo se libera del profármaco tras la ciclización-activación por formación de imida cíclica. La cinética de liberación depende del valor de pH y es mínima para el almacenamiento del profármaco a valores de pH entre 4,5 y 5, y alcanza su tasa de liberación destinada a pH fisiológico de aproximadamente 7,4 a 7,5. Se describe un profármaco agonista de GLP-1 en donde el enlazador se basa en L-alanina y el vehículo polimérico es un hidrogel basado en PEG-lisina. No se describen profármacos-agonistas de GLP-1/Glucagón duales.

Ácido hialurónico (HA)

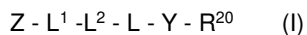
Dhal et al (Journal of Biomedical Nanotechnology, vol 9, 2013, 1 - 13) describen el ácido hialurónico como un vehículo adecuado para conjugados de fármacos. Kong et al. (Biomaterials 31 (2010), 4121 - 4128) describen un conjugado de exendina-4-ácido hialurónico que demostró un efecto reductor de la glucosa en 3 días en ratones. El HA utilizado fue un polímero lineal con una carga de fármaco en el intervalo de aproximadamente 2,4 a 12%.

En la presente invención, se eligen los hidrogeles de ácido hialurónico reticulado debido a su mayor tiempo de residencia en un depósito local en el sitio de aplicación en comparación con el HA soluble. Los criterios importantes para el uso de ácido hialurónico (HA) como vehículo de polímero consisten en que la carga de fármaco obtenible en el producto de fármaco final es determinada por la carga del fármaco en el polímero propiamente dicho y la concentración de la disolución/suspensión final. De hecho, el volumen de inyección para depósitos de fármaco subcutáneos se limita prácticamente a igual/menos de 1 ml, preferiblemente igual/menos de 0,6 ml.

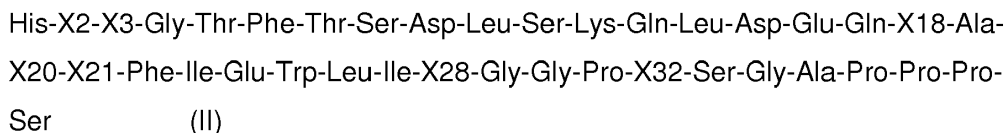
Cuanto más concentradas sean las disoluciones/suspensiones poliméricas de HA, más viscosa será la formulación, lo cual tiene un impacto negativo en la capacidad de uso de la jeringa en la formulación del profármaco. Las disoluciones viscosas necesitan agujas para inyección de un diámetro mayor para limitar la fuerza en el émbolo desde el cual se presiona la jeringa. También el tiempo para inyección es más prolongado.

Es un objeto de la presente invención dar a conocer un profármaco agonista de GLP-1/Glucagón para administrar como un depósito subcutáneo que libera el agonista de GLP-1/Glucagón en forma activa durante un periodo de tiempo de por lo menos 6 días entre las administraciones y que puede inyectarse con agujas de gauge 26 o incluso agujas de diámetro interior más pequeño para el buen cumplimiento por parte del paciente.

Un objeto de la invención es un profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, que comprende un conjugado de enlazador de fármaco de fórmula (I)



en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (II)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Lys

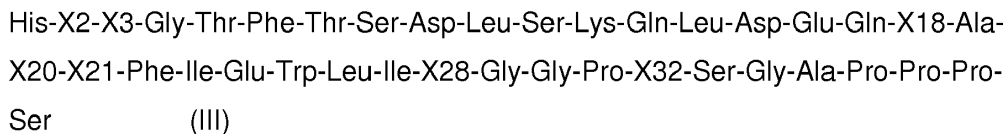
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (III)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Leu y His

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

5 o

en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IV)

His-X2-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Asp-Glu-Gln-X18-Ala-
Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-X32-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-
Ser (IV)

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

10 X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o

en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVa)

H₂N-His-Aib-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-X15-Glu-Gln-Leu-Ala-
Arg-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-X29-Gly-X31-X32-Ser-X34-X35-Pro-Pro-Pro-
X39-R²⁰ (IVa)

15 X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu, preferiblemente Asp

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro, preferiblemente Gly, D-Ala

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp, preferiblemente Pro

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg, preferiblemente Ser, His, Pro,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

20 X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys, preferiblemente Ala, Pro

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro,

o

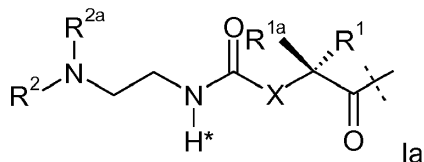
en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVb)

H₂N-His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Glu-Glu-Gln-Arg-
Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-D-Ala-Gly-Pro-Pro-Ser-D-Ala -Ala-
Pro-Pro-Pro-Ser-R²⁰;

25 o su sal o solvato;

R²⁰ es OH o NH₂;

L es un enlazador de fórmula (Ia),



en donde la línea discontinua indica la sujeción del término N de Y, formando una unión amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴);

R¹, R^{1a} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

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

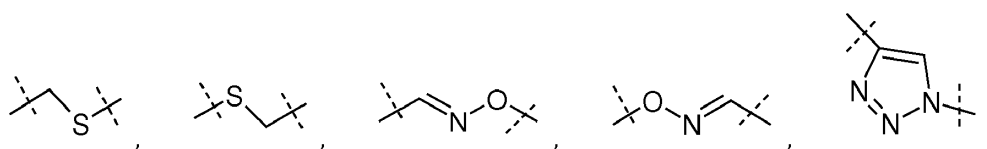
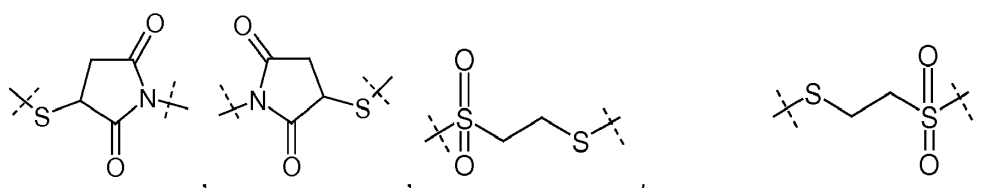
5 R⁴, R^{4a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

en donde R², R^{2a}, R⁴ o R^{4a} se sustituye con un grupo L²-L¹-Z; en donde

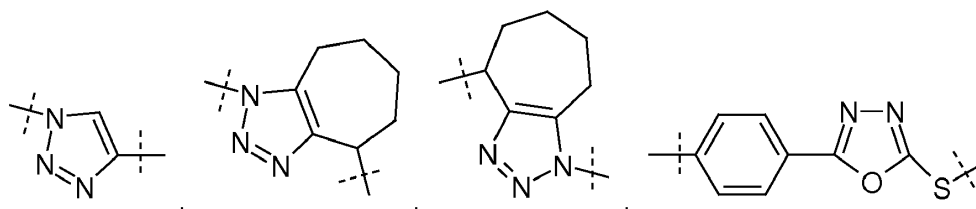
L² es una unión química sencilla o es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida por uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}), en donde R^{3aa} y R^{3aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

10

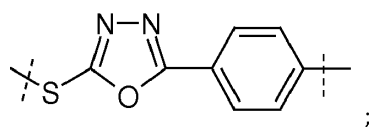
L² está sujeto a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



15



y



20

en donde L² está sujeto a una posición indicada con la línea discontinua y L¹ está sujeto a la posición indicada con la otra línea discontinua; y

L¹ es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, opcionalmente interrumpida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{5aa}) y opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{5aa}R^{5aaa}), en donde R^{5aa} y R^{5aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

25

L¹ está sujeto a Z mediante un grupo amino terminal que forma una unión amida con el grupo carboxi del ácido beta-1,3-D-glucurónico del ácido hialurónico de Z;

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

0,05 a 20 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulante; y

0,2 a 8,5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

La presente invención se refiere a un profármaco que proporciona la liberación de un agonista de GLP-1/Glucagón de un depósito subcutáneo en una forma activa durante un periodo de tiempo de por lo menos 6 días entre las administraciones.

5 Esto ayuda a los pacientes a reducir la frecuencia de las inyecciones, a la vez que se mantiene el control óptimo de los niveles en plasma de agonista de GLP-1/Glucagón y en consecuencia de la glucosa en sangre.

Otras ventajas del vehículo de ácido hialurónico reticulado de la invención son su buena inyectabilidad mediante una aguja de gauge 26 o incluso una aguja de diámetro interior más pequeño.

Leyendas de las figuras

10 Figura 1a, Figura 1b, Figura 1c muestran diversas químicas de reticulación para sintetizar hidrogeles de ácido hialurónico.

Figura 2a. Imágenes de resonancia magnética (RMN) del hidrogel de HA en el sitio de inyección, tomadas en diferentes puntos de tiempo.

Figura 2b. Imágenes de resonancia magnética (RMN) de la suspensión polimérica que contiene 1:1 (p/p) hidrogel de HA- 800 kDa HA soluble en el sitio de inyección, tomadas en diferentes puntos de tiempo.

15 Figura 3. Cinética de liberación *in vitro* del agonista dual de Exendina-4 –Seq ID No. 26 con el enlazador semanal del hidrogel de HA (ejemplo 18). La semivida es de 5 días.

Figura 4 Efecto *in vivo* del conjugado hidrogel de HA – agonista dual (Seq ID No. 26) en glucosa sanguínea no en ayunas en ratones db/db: se muestra la diferencia del nivel de glucosa en sangre en mmol/l frente al tiempo de tratamiento de los animales para distintas dosis.

20 Figura 4b Efecto *in vivo* del conjugado hidrogel de HA – agonista dual (Seq ID No. 26) en glucosa sanguínea no en ayunas en ratones db/db: se muestra la diferencia del nivel de glucosa en sangre en mmol/l frente al tiempo de tratamiento de los animales para distintos constructos de hidrogel: ácido hialurónico soluble y reticulado.

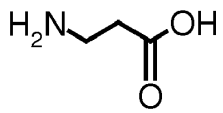
25 Figura 4c Efecto *in vivo* del conjugado hidrogel de HA – agonistas duales (Seq ID No. 45, 46 y 48) en glucosa sanguínea no en ayunas en ratones db/db: se muestra el nivel de glucosa en sangre en mmol/l frente al tiempo de tratamiento de los animales.

Figura 4d Efecto *in vivo* del conjugado hidrogel de HA – agonista dual (Seq ID No. 49) en glucosa sanguínea no en ayunas en ratones db/db: se muestra el nivel de glucosa en sangre en mmol/l frente al tiempo de tratamiento de los animales.

30 Figura 5 Estudio de inyectabilidad: Fuerza de extrusión en el émbolo de la jeringa para hidrogeles de HA de diferentes cargas de péptidos.

Descripción detallada

35 Las secuencias de aminoácidos de la presente invención contienen los códigos convencionales de una letra y tres letras para aminoácidos naturales, además de los códigos de tres letras generalmente aceptados para otros aminoácidos, como Aib (ácido α -aminoisobutírico). Asimismo, el siguiente código se usa para el aminoácido que se muestra en la tabla que sigue.

Nombre	Estructura	Código
beta alanina		Bal
D-alanina		D-Ala

El agonista de GLP-1/Glucagón unido al enlazador se denomina "resto agonista de GLP-1/Glucagón".

40 "Grupos protectores" se refiere a un resto que protege temporalmente un grupo funcional químico de una molécula durante la síntesis para obtener quimioselectividad en las reacciones químicas subsiguientes. Los grupos protectores para alcoholes son, por ejemplo, bencilo y tritilo, los grupos protectores para aminas son, por ejemplo,

terc-butiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo y bencilo y para los ejemplos de tioles de grupos protectores son 2,4,6-trimetoxibencilo, fenitiometilo, acetamidometilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, terc-butiltio, trifenilmetilo, 3-nitro-2-piridiltio, 4-metiltrilito.

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

- 5 "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 de 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 con un sustituyente.

- 10 "Ariolo" se refiere a cualquier sustituyente derivado de un anillo aromático monocíclico o policíclico o condensado, incluidos anillos heterocíclicos, p. ej., fenilo, tiofeno, indolilo, naftilo, piridilo, que pueden además estar sustituidos.

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

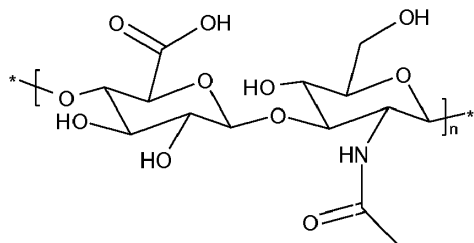
- 15 "Alquilo C₁₋₄" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 4 átomos de carbono, p. ej., si está presente al final de la molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo o, p. ej., -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando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

- 20 "Alquilo C₁₋₆" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 6 átomos de carbono, p. ej., si está presente al final 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 unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₆ se puede reemplazar con un sustituyente.

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.

- 25 "Halógeno" significa fluoro, cloro, bromo o yodo. En general se prefiere que el halógeno sea fluoro o cloro.

"Ácido hialurónico" significa un polímero de un disacárido compuesto por ácido beta-1,3-D-glucurónico y beta-1,4-N-acetil-D-glucosamina y sus respectivas sales de sodio. Estos polímeros son lineales.



- 30 "Unidad de disacárido" significa el disacárido compuesto por ácido beta-1,3-D-glucurónico y beta-1,4-N-acetil-D-glucosamina y sus respectivas sales de sodio, y es el bloque de construcción monomérico para HA.

"Ácido hialurónico reticulado" significa un polímero de ácido hialurónico en donde distintas cadenas de HA se conectan en forma covalente mediante un reticulador que forma una red polimérica tridimensional. El grado de reticulación se refiere a la relación molar de las unidades de disacárido en la red polimérica.

- 35 El "ácido hialurónico reticulado" puede derivar de diferentes métodos. La reacción de HA con el reticulante, la reacción de HA modificado (activado) con el reticulante, la reacción de dos HA modificados distintos con el reticulante. Los ejemplos se pueden describir en Oh et al, Journal of Controlled Release 141 (2010), 2-12. El ejemplo 11 describe la reticulación de HA no modificado con divinilsulfona. Otros métodos para preparar HA reticulado se describen también en la figura 1a, Figura 1b y en la Figura 1c: aldehído (oxidación de diol) y la subsiguiente aminación reductora de amina, alquilación mediada por hidroxilo, reacción de formación de amida, reticulación por adición Michael (Tiol - maleimida), química de diol - epóxido y otras.

- 40 "Reticulante" puede ser un grupo químico o molécula lineal o ramificada, preferiblemente una molécula lineal con por lo menos grupos funcionales químicos en cada extremo distal.

- 45 "Ácido hialurónico funcionalizado" significa un polímero de ácido hialurónico en donde el HA está químicamente modificado con un grupo L¹ que porta un grupo químico funcional en su extremo distal. El grado de funcionalización se refiere a la relación molar de unidades de disacárido a unidades L¹ en el polímero.

- 5 La expresión "grupo funcional químico" se refiere, aunque sin limitarse a ello, 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, alquil haluros, acrilóilo y otros aceptores Michael insaturados alfa-beta, agentes arilantes como aril fluoruros, hidroxilamina, disulfuros como piridil disulfuro, vinil sulfona, vinil cetona, diazoalcanos, compuestos diazoacetilo, oxirano y aziridina.
- Si un grupo funcional químico se acopla a otro grupo funcional químico, la estructura química resultante se denomina "enlace". Por ejemplo, la reacción de un grupo amina con un grupo carboxilo resulta en una unión amida.
- 10 "Grupos funcionales reactivos" son grupos funcionales químicos del resto del esqueleto, que se conectan al resto hiperramificado.
- "Grupo funcional" es la expresión colectiva utilizada para "grupo funcional reactivo", "grupo funcional interconectado degradable" o "grupo funcional conjugado".
- 15 Las expresiones "grupo bloqueante" o "grupo tope" se usan como sinónimos y se refieren a restos que están conectados de manera irreversible a grupos funcionales reactivos para tornarlos incapaces de reaccionar con, por ejemplo, grupos funcionales reactivos.
- La expresión "grupo que protege" o "grupo protector" se refiere a un resto que se conecta en forma irreversible a grupos funcionales reactivos para tornarlos incapaces de reaccionar con, por ejemplo, otros grupos funcionales químicos bajo condiciones específicas.
- 20 El término "derivados" se refiere a grupos funcionales químicos adecuadamente sustituidos con grupos protectores y/o de activación o a formas activadas de un grupo funcional químico correspondiente que conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formas activadas de grupos carboxilo incluyen, aunque sin limitarse a ello, ésteres activos, tales como succinimil éster, benzotriazol éster, nitrofenil éster, pentafluorofenil éster, azabenzotriazol éster, acil halogenuros, anhídridos mixtos o simétricos, acil imidazol.
- 25 La expresión "enlazador no enzimáticamente escindible" se refiere a enlazadores que son hidrolíticamente degradables bajo condiciones fisiológicas sin actividad enzimática.
- El término "espaciador" y las expresiones "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, se refieren a cualquier resto adecuado para conectar dos restos, tales como alquilo C₁₋₅₀, cuyo fragmento está opcionalmente interrumpido por uno o más grupos seleccionados entre -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-.
- 30 Los términos "terminal", "término" o la expresión "extremo distal" se refieren a la posición de un grupo funcional o enlace dentro de una molécula o resto, mediante lo cual dicho grupo funcional puede ser un grupo químico funcional y el enlace puede ser un enlace degradable o permanente, caracterizado por estar localizado adyacente a o dentro de un enlace entre dos restos o al final de una cadena oligomérica o polimérica.
- 35 Las frases "en forma ligada" o "resto" hacen referencia a subestructuras que son parte de una molécula más grande. La frase "en forma ligada" se usa para simplificar la referencia a restos nombrando o enumerando reactivos, materiales de partida o materiales de partida hipotéticos bien conocidos en la técnica, y en donde "en forma ligada" significa que, por ejemplo, uno o más radicales hidrógeno (-H), o uno o más grupos activadores o protectores presentes en los reactivos o materiales de partida no están presentes en el resto.
- 40 Se ha de entender que todos los reactivos y restos que comprenden restos poliméricos se refieren a entidades macromoleculares conocidas por exhibir variabilidades con respecto a peso molecular, longitudes de cadenas o grado de polimerización, o el número de grupos funcionales. Las estructuras que se muestran para reactivos de reticulación, y restos reticulados son por lo tanto solamente ejemplos representativos.
- 45 Un reactivo o resto puede ser lineal o ramificado. Si el reactivo o resto tiene dos grupos terminales, se refiere a un reactivo o resto lineal. Si el reactivo o resto tiene más de dos grupos terminales, se considera un reactivo o resto ramificado o multifuncional.
- Los enlazadores empleados en dichos profármacos enlazados a vehículos son transitorios, lo que significa que son no enzimáticamente e hidrolíticamente degradables (escindibles) bajo condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas que oscilan entre, por ejemplo, una hora y tres meses.
- 50 La expresión "profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón" se refiere a profármacos enlazados a vehículos de agonista de GLP-1/Glucagón, en donde el vehículo es un hidrogel. Las expresiones "profármaco de hidrogel" y "profármaco enlazado a hidrogel" se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos transitoriamente enlazados a un hidrogel, y se usan como sinónimos.

- 5 Un "hidrogel" se puede definir como una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfífila capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de reticulaciones químicas o físicas covalentes (interacciones iónicas, hidrófobas, enmarañamientos). Las reticulaciones proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con agua, lo que les permite expandirse en medio acuoso. Las cadenas de la red se conectan en un modo tal que existan poros y que una fracción de estos tenga dimensiones entre 1 nm y 1000 nm.
- "Forma libre" de un fármaco se refiere a un fármaco, específicamente a un agonista de GLP-1/Glucagón, en su forma farmacológicamente activa no modificada, tal como después de ser liberada de un conjugado de polímero.
- 10 El término "fármaco" y las expresiones "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo", se utilizan como sinónimos y se refieren al agonista de GLP-1/Glucagón, o bien en su forma ligada o libre.
- 15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agonista de GLP-1/Glucagón, tal como se emplea en esta memoria, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, además del peso y el estado general del sujeto. Se ha de entender que determinar una dosis apropiada se puede lograr usando experimentación de rutina, construyendo una matriz de valores y ensayando diferentes puntos en la matriz, todos dentro de la experiencia ordinaria de un médico capacitado.
- 20 "Estable" y "estabilidad" significan que dentro del tiempo de almacenamiento indicado, los conjugados de hidrogel permanecen conjugados y no se hidrolizan hasta un grado sustancial y exhiben un perfil de impurezas aceptable en relación con el agonista de GLP-1/Glucagón. Para considerarse estable, la composición contiene menos de 5% del fármaco en su forma libre.
- 25 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador tal como EMEA (Europa) y/o FDA (EE. UU.) y/o cualquier otro organismo regulador para uso en animales, preferiblemente en seres humanos.
- 30 "Composición farmacéutica" o "composición" significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes, además de cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejo o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (vehículo farmacéuticamente aceptable).
- 35 "Composición seca" significa que la composición de profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón se provee en forma seca en un recipiente. Los métodos adecuados para secar son, por ejemplo, secado con pulverización y liofilización (secado por congelación). Dicha composición seca de profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón tiene un contenido de agua residual de un máximo de 10 %, preferiblemente menos de 5% y más preferiblemente menos de 2% (determinado de conformidad con el método de Karl Fischer). El método preferido de secado es la liofilización. "Composición liofilizada" significa que la composición de profármaco de polímero de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón primero se congeló y luego se sometió a reducción acuosa mediante presión reducida. Esta terminología no excluye etapas de secado adicionales que ocurren en el proceso de fabricación antes de rellenar la composición en el recipiente final.
- 40 "Liofilización" (secado por congelación) es un proceso de deshidratación, caracterizado por congelar una composición y luego reducir la presión circundante y, opcionalmente, añadir calor para permitir que el agua congelada en la composición se sublime directamente de la fase sólida a la fase gaseosa. Típicamente, el agua sublimada se recoge por desublimación.
- 45 "Reconstitución" significa la adición de un líquido a una composición seca para convertirlo en la forma de una composición líquida o suspensión. Se ha de entender que el término "reconstitución" no está limitado a la adición de agua, sino que se refiere a la adición de cualquier líquido, incluidos, por ejemplo, tampones u otras disoluciones acuosas.
- 50 "Disolución para reconstitución" se refiere al líquido utilizado para reconstituir la composición seca de un profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón antes de la administración a un paciente que lo necesita.
- "Recipiente" significa cualquier recipiente en el cual está comprendida la composición de profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón y que se puede conservar hasta reconstituir.
- 55 "Tampón" o "agente tampón" se refiere a compuestos químicos que mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones fisiológicamente tolerados son, por ejemplo, fosfato de sodio, succinato, histidina, bicarbonato, citrato y acetato, piruvato. Los antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$ también se pueden utilizar. La capacidad tampón se puede ajustar para igualar 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, estabilizantes, agentes anti-adsorción, agentes de protección contra oxidación u otros agentes auxiliares. No obstante, en algunos casos, un excipiente puede tener funciones duales 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 al secarse en general y especialmente durante la liofilización y posterior almacenamiento. Los lioprotectores ilustrativos incluyen azúcares, 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), y sus combinaciones.

"Tensioactivo" hace referencia a agentes humectantes que reducen la tensión superficial de un líquido.

"Modificadores de isotonicidad" se refiere a compuestos que minimizan el dolor que pueden resultar de daño celular a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección.

- 15 El término "estabilizantes" se refiere a compuestos utilizados para estabilizar el profármaco de polímero. La estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas estabilizadoras de proteínas, desestabilización del estado desnaturalizado o unión directa de excipientes a la proteína.

- 20 "Agentes anti-adsorción" se refiere principalmente a tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles utilizados para recubrir o adsorber competitivamente la superficie interior del recipiente de la composición. La concentración y el tipo de excipientes seleccionados depende del efecto que se ha de evitar pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interface justo encima del valor CMC.

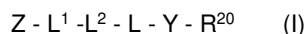
"Agentes de protección contra oxidación" se refiere a antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, glutatona, metionina, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), propil galato, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafofato, ácido tioglicólico.

- 25 "Antimicrobiano" se refiere a una sustancia química que inactiva o inhibe el crecimiento de microorganismos, tal como bacterias, hongos, levaduras, protozoos, y/o que destruye virus.

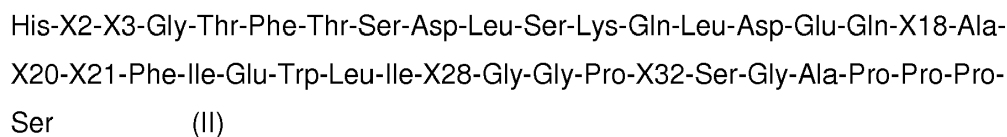
"Sellar un recipiente" significa que el recipiente se cierra de modo tal que queda hermético, imposibilitando el intercambio gaseoso entre el exterior y el interior y manteniendo el contenido estéril.

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

Un objeto de la invención es un profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, que comprende un conjugado de enlazador de fármaco de fórmula (I)



en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (II)



- 35 X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Lys

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

- 40 X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (III)

His-X2-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-Asp-Glu-Gln-X18-Ala-
X20-X21-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-X28-Gly-Gly-Pro-X32-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-
Ser (III)

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Leu y His

5 X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o

10 en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IV)

His-X2-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Asp-Glu-Gln-X18-Ala-
Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-X32-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-
Ser (IV)

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

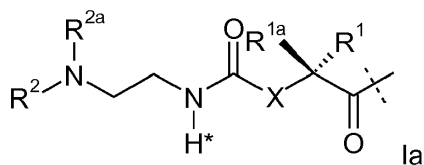
X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

15 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o su sal o solvato;

R²⁰ es OH o NH₂;

L es un enlazador de fórmula (Ia),



20 en donde la línea discontinua indica la sujeción al término N de Y formando una unión amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴);

R¹, R^{1a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

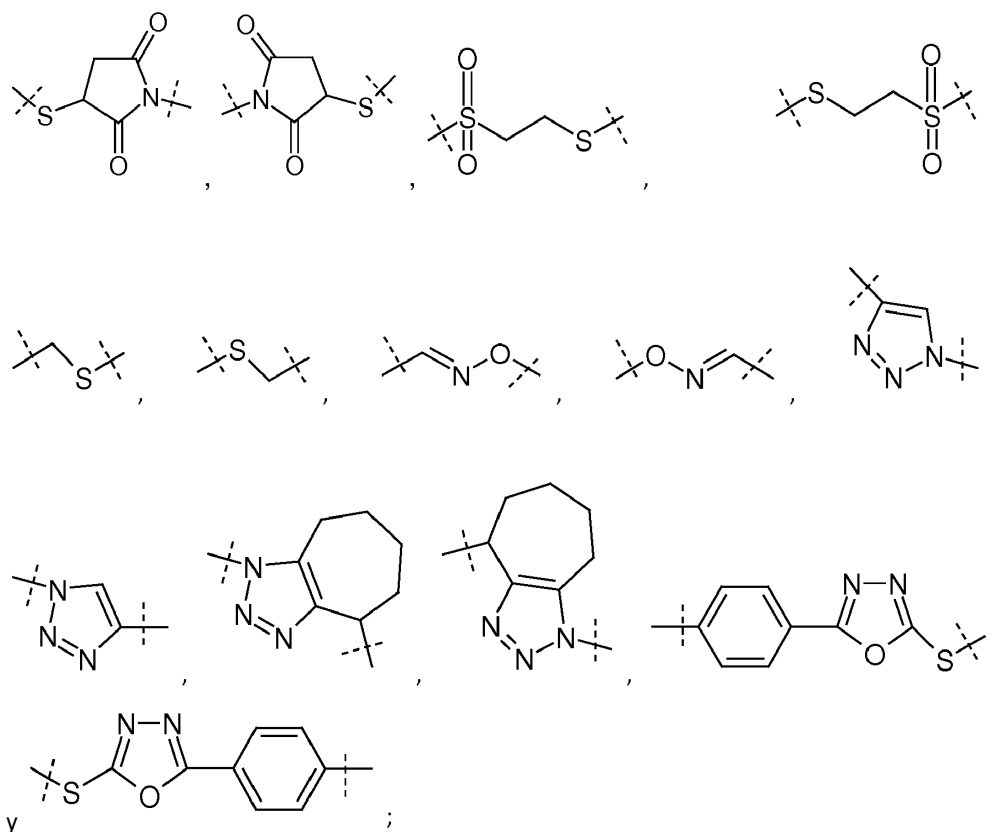
R², R^{2a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

R⁴, R^{4a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

25 en donde R², R^{2a}, R⁴ o R^{4a} se sustituye con un grupo L²-L¹-Z; en donde

L² es una unión química sencilla o una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}), en donde R^{3aa} y R^{3aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

30 L² está sujeto a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



5

en donde L² está sujeto a la posición indicada con la línea discontinua y L¹ está sujeto a la posición indicada con la otra línea discontinua; y

10 L¹ es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{5aa}) y está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{5aa}R^{5aaa}), en donde R^{5aa} y R^{5aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

L¹ está unido a Z mediante un grupo amino terminal que forma una unión amida con el grupo carboxi del ácido beta-1,3-D-glucurónico del ácido hialurónico de Z;

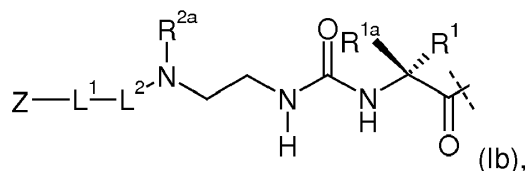
15 Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

0,05 a 20 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulante; y 0,2 a 8,5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

Otras realizaciones de L, L¹, L², Z y Y.

En otra realización

20 L es un resto enlazador de fórmula (Ib),



en donde la línea discontinua indica la sujeción a Y formando una unión amida;

R¹, R^{1a}, R^{2a} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄;

L²-L¹-Z es como se definió anteriormente.

25 En otra realización

L es un resto enlazador de fórmula (lb), en donde

R¹ es CH₃;

R^{1a} es H;

R^{2a} es H; y

5 L²-L¹-Z es como se describió anteriormente.

En otra realización

L es un resto enlazador de fórmula (lb), en donde

R¹ es H;

R^{1a} es CH₃;

10 R^{2a} es H; y

L²-L¹-Z es como se describió anteriormente.

En otra realización

L es un resto enlazador de fórmula (lb), en donde

R¹ es CH₃;

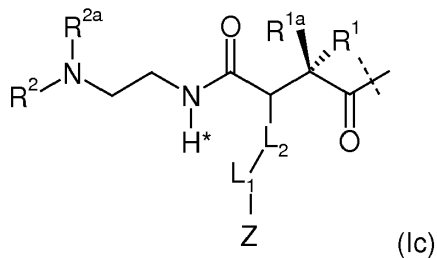
15 R^{1a} es CH₃;

R^{2a} es H; y

L²-L¹-Z es como se describió anteriormente.

En otra realización

L es un resto enlazador -L de fórmula (lc),



20

en donde la línea discontinua indica la sujeción a Y formando una unión amida;

R¹ se selecciona entre H o alquilo C₁₋₄, preferiblemente H;

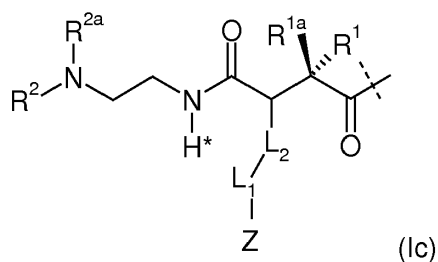
R^{1a} se selecciona entre H o alquilo C₁₋₄, preferiblemente H;

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

25 en donde L²-L¹-Z es como se describió anteriormente.

En otra realización

L es un resto enlazador -L de fórmula (lc),



en donde la línea discontinua indica la sujeción a Y formando una unión amida;

R¹ y R^{1a} son H;

R², R^{2a} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y CH₃;

5 en donde L²-L¹-Z se define como se describió anteriormente.

En otra realización

L es un resto enlazador -L de fórmula (Ic), en donde

R¹ y R^{1a} son H;

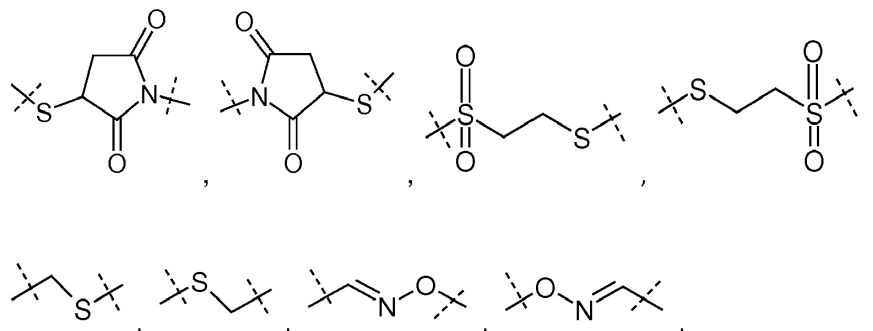
R² es H y R^{2a} es CH₃;

10 en donde L²-L¹-Z se define como se describió anteriormente.

En otra realización

L² es una cadena de alquilo C₁₋₁₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o dos grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y en donde R^{3aa} se selecciona en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

15 L² está sujeta a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



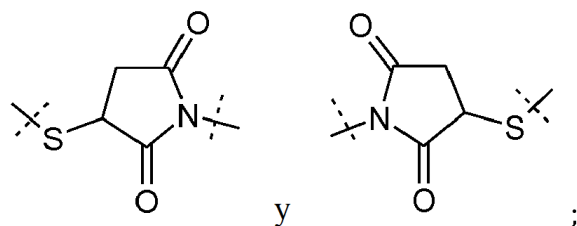
en donde L² está sujeta a la posición indicada con la línea discontinua y

20 L¹ está sujeta a la posición indicada con la otra línea discontinua; y

En otra realización

L² es una cadena de alquilo C₁₋₆, que está opcionalmente interrumpida con un grupo seleccionado entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y, en donde R^{3aa} se selecciona en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

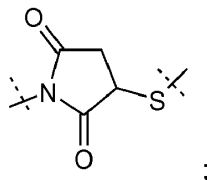
L² está sujeta a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



en donde L² está sujeto a la posición indicada con la línea discontinua y L¹ está sujeto a la posición indicada con la otra línea discontinua.

En otra realización

- 5 L² es -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)NH- o -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- y está unido a L¹ mediante el grupo terminal



en donde L² está sujeto al átomo de azufre indicado con la línea discontinua, y L¹ está sujeto a un átomo de nitrógeno indicado con la línea discontinua.

- 10 En otra realización

L¹ es una cadena de alquilo C₁₋₁₀, con un grupo amino en un extremo distal, que está opcionalmente interrumpido con uno o dos grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{5aa}) y, en donde R^{5aa} se selecciona en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄.

Otra realización se refiere a profármacos, en los que

- 15 Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde 0,05 a 15 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulante.

Otra realización se refiere a profármacos, en donde

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde 1 a 10 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulante.

- 20 Otra realización se refiere a profármacos, en donde

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde 0,2 a 8,5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

Otra realización se refiere a profármacos, en donde

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

- 25 0,2 a 6 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

Otra realización se refiere a profármacos, en donde

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

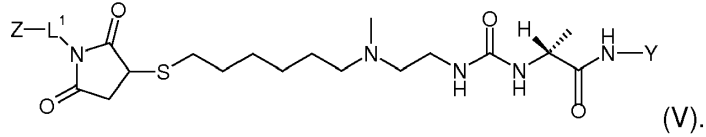
0,2 a 5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

Otra realización se refiere a profármacos, en donde

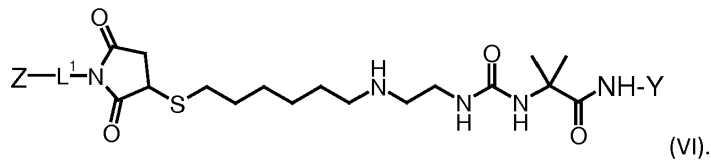
- 30 Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

0,4 a 4 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos $L^1-L^2-L-Y-R^{20}$.

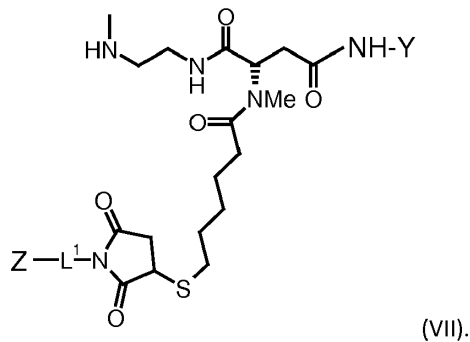
En otra realización, el profármaco agonista de GLP-1/Glucagón tiene una estructura según lo representado por la fórmula (V)



5 En otra realización, el profármaco agonista de GLP-1/Glucagón tiene una estructura según lo representado por la fórmula (VI) (enlazador Aib)



10 En otra realización, el profármaco agonista de GLP-1/Glucagón tiene una estructura según lo representado por la fórmula (VII)



Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

15 X18 representa Arg

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

20

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un D-Ser

X3 representa His,

X18 representa Arg

25 X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa D-Ser,

5 X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa Arg,

X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa Ala,

10 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa His,

15 X18 representa Arg,

X20 representa Lys,

X21 representa Asp,

X28 representa Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

20

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Lys,

25 X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

30 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un aminoácido seleccionado entre Arg y Lys,

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

35 X21 representa Asp,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

ES 2 759 752 T3

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un aminoácido seleccionado entre Arg y Lys,

5 X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa Ser.

10 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa Arg

X20 representa Lys,

15 X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa Ala,

X32 representa Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

20 X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa Leu

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

25 X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

X2 representa Aib,

30 X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu;

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

35 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

ES 2 759 752 T3

X2 representa Aib,

X3 representa His,

X18 representa Leu,

X20 representa Lys,

5 X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

10 X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu,

X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

15 X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

20 X3 representa Gln,

X18 representa Leu,

X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa Ala,

25 X32 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

30 X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu,

X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

35

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

ES 2 759 752 T3

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,
X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu,
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,
X21 representa Asp,

- 5 X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,
X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde
X2 representa Aib,

- 10 X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,
X18 representa Leu,
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys y Gln,
X21 representa Glu,
X28 representa Ala,
15 X32 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde
X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

- X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,
20 X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu,
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,
X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,
X28 representa Ala,
X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

25 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (III), en donde
X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

- X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,
X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His y Leu,
30 X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,
X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,
X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,
X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

- 35 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido Y de fórmula (II) o (III), en donde
X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Aib y D-Ser,

ES 2 759 752 T3

X3 representa His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Leu y Arg,

X20 representa Lys,

5 X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IV), en donde

10 X2 representa D-Ser,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

15 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IV), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu, particularmente Leu,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

20

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IV), en donde

X2 representa D-Ser,

X3 representa Gln,

X18 representa Arg,

25 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

Otra realización se refiere además a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IV), en donde

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

30 X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

X32 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula

35 (IVa)

ES 2 759 752 T3

H₂N-His-Aib-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-X15-Glu-Gln-Leu-Ala-
Arg-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-X29-Gly-X31-X32-Ser-X34-X35-Pro-Pro-Pro-
X39-R²⁰ (IVa)

en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu, (pref. Asp)

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro, (pref) Gly, D-Ala

5 X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp, (pref. Pro)

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg, (pref. Ser, His, Pro),

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys, (pref. Ala, Pro)

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro,

10 o su sal o solvato.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

15 X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

X39 representa Ser.

20

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X29 representa Gly,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

25 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

30 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X29 representa Gly,

X31 representa Pro,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His y Pro,

35 X34 representa Gly,

ES 2 759 752 T3

X35 representa Ala,

X39 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

5 X15 representa Asp,

X29 representa D-Ala,

X31 representa Pro,

X32 representa Pro,

X34 representa D-Ala,

10 X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala y Pro,

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

15 X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

X31 representa Pro,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

20 X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa Gly,

25 X31 representa His,

X32 representa Pro,

X34 representa Gly,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala y Lys,

X39 representa Ser.

30

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y Pro,

X31 representa Pro,

35 X32 representa Ser,

X34 representa Gly,

X35 representa Ala,

ES 2 759 752 T3

X39 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

5 X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

X32 representa Pro,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

10 X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y Pro,

15 X31 representa Pro,

X32 representa His,

X34 representa Gly,

X35 representa Ala,

X39 representa Ser.

20

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

25 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa Gly,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

30 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa D-Ala,

X31 representa Pro,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Pro,

35 X34 representa D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala y Pro,

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

ES 2 759 752 T3

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

5 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa Ala,

X39 representa Ser.

10 Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa Asp,

X29 representa Gly,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro y His,

X32 representa Pro,

15 X34 representa Gly,

X35 representa Lys,

X39 representa Ser.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

20 X15 representa Asp,

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X31 representa Pro,

X32 representa Pro,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

25 X35 representa Pro,

X39 representa Pro-Pro-Pro.

Otra realización se refiere a un grupo de profármacos que tienen un resto de péptido de fórmula (IVa), en donde

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

30 X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro,

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys,

35 X39 representa Ser.

En una realización, Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón de Seq. ID No 60.

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 4 a 60.

ES 2 759 752 T3

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 4 a 44.

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 4 a 22.

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 23 a 39.

5 En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 40 a 44.

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 45 a 59.

10 En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 18, 21 y 26.

En una realización Y se refiere a un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No 18, 21, 26, 45, 48, 49 y 60.

Tabla 1

SEQ ID	secuencia
1	H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
2	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-C-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH2
3	H-S-C-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-C-D-F-V-C-W-L-M-N-T
4	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
5	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
6	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
7	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
8	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
9	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-Q-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
10	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-S-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2

ES 2 759 752 T3

SE Q ID	secuencia
11	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
12	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-H-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
13	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
14	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V- S-G-A-P-P-P-S-NH2
15	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-Q-D-F-I-E-W-L-I-S-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
16	H-S-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V-S- G-A-P-P-P-S-NH2
17	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P- V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
18	H-dSer-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P- V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
19	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V- S-G-A-P-P-P-S-NH2
20	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-I-S-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
21	H-dSer-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P- S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
22	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-K-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P- S-S-G-A-P-P-P-S-
23	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
24	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-H-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S- S-G-A-P-P-P-S-NH2
25	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P- S-S-G-A-P-P-P-S-NH2

ES 2 759 752 T3

SEQ ID	secuencia
26	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
28	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
29	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
30	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-S-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
31	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-K-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
32	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
33	H-dSer-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
34	H-S-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
35	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
36	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
37	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-H-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
38	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-Q-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
39	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-Q-E-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
40	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
41	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2

ES 2 759 752 T3

SEQ ID	secuencia
42	H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-D-E-Q-R-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-V-S-G-A-P-P-P-S-NH2
43	H-dSer-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
44	H-S-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-D-E-Q-L-A-K-D-F-I-E-W-L-I-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
45	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
46	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-P-S-G-A-P-P-P-S-NH2
47	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-P-S-G-P-P-P-P-P-P-NH2
48	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-dAla-G-P-P-S-dAla-P-P-P-P-P-P-NH2
49	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-H-S-G-A-P-P-P-S-NH2
50	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-P-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
51	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-P-G-P-P-S-G-A-P-P-P-S-NH2
52	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-P-G-P-H-S-G-A-P-P-P-S-NH2
53	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-P-S-G-K-P-P-P-S-NH2
54	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-H-P-S-G-A-P-P-P-S-NH2
55	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-W-P-S-G-A-P-P-P-S-NH2
56	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-H-P-S-G-K-P-P-P-S-NH2
57	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-E-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-P-S-G-A-P-P-P-S-NH2

SE Q ID	secuencia
58	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-G-G-P-R-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
59	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-L-D-E-Q-L-A-R-D-F-I-E-W-L-I-Bal-dAla-G-P-P-S-dAla-A-P-P-P-S-NH ₂
60	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-L-E-E-Q-R-A-R-E-F-I-E-W-L-I-Bal-dAla-G-P-P-S-dAla-A-P-P-P-S-NH ₂

Otra realización es el péptido de la Seq. ID No. 60 y su uso como producto farmacéutico.

En caso de que los profármacos de agonista de GLP-1/Glucagón que comprenden los compuestos según la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus correspondientes sales farmacológica o toxicológicamente aceptables. Po lo tanto, los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón que comprenden los compuestos de la fórmula (I) que contienen grupos ácidos se pueden usar de acuerdo con la invención, por ejemplo, como sales de metal alcalino, sales de metal alcalino térreo o 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, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón que comprenden los compuestos de fórmula (I) que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que se pueden protonar, pueden estar presentes y se pueden utilizar de acuerdo con 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, ácido naftalenosulfónico, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido piválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfámico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos por el experto en la técnica. Si los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón que comprenden los compuestos de 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 betaínas (zwitteriones). Las respectivas sales de acuerdo con los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón que comprenden la fórmula (I) se pueden obtener por métodos habituales conocidos por el experto en la técnica como, por ejemplo, poniendo en contacto estos con ácido o base orgánica o inorgánica en un disolvente o dispersante, o por intercambio aniónico o intercambio catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón que comprenden los compuestos de fórmula (I) que, debido a la poca compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuados para uso en productos farmacéuticos que se pueden usar, por ejemplo, como intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

Procedimiento de elaboración

Los péptidos Y se pueden preparar por métodos convenientes conocidos en la técnica.

Los enlazadores L se preparan por los métodos descritos en los ejemplos y en las publicaciones internacionales WO2009/095479, WO2011 /012718 y WO2012/035139.

El profármaco agonista de GLP-1/Glucagón unido a hidrogel de la presente invención se puede preparar sintetizando los bloques de construcción activados por el hidrogel de ácido hialurónico Z-L^{1*} y el conjugado del enlazador de péptido activado L^{2*}-L-Y.

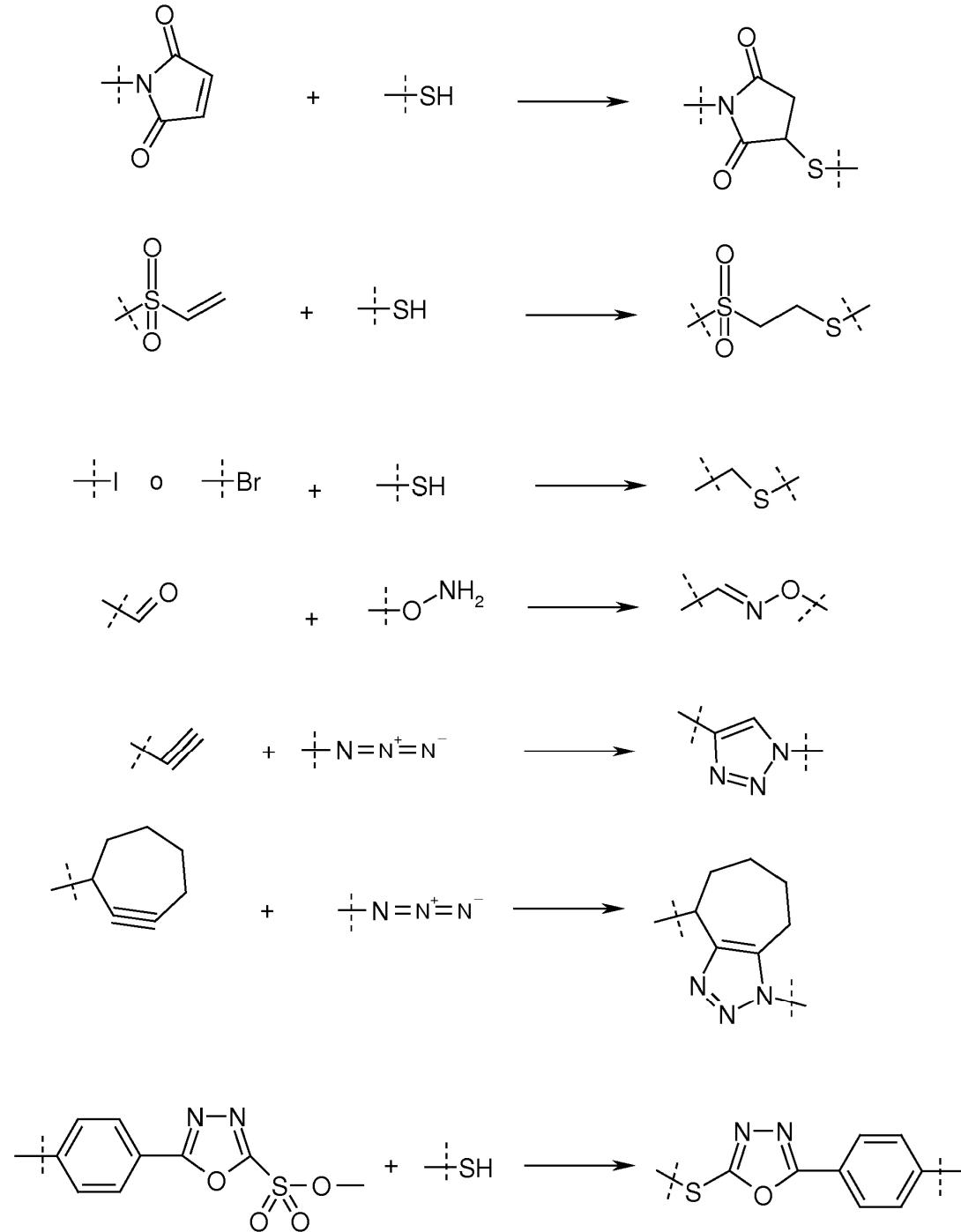
Los grupos activados L^{1*} y L^{2*} se usan para conjugar el péptido a los polímeros.

El Esquema 1 muestra distintos tipos de químicas de enlace que se pueden usar para conjugar el péptido con enlazadores auto-destructivos al polímero. Por lo tanto, además de la química de tiol-maleimida, se pueden usar otras químicas biortogonales. En el esquema 1, las líneas discontinuas indican las posiciones en las que L¹ y L² están unidos.

Después de cargar el conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón-enlazador al hidrogel de ácido hialurónico funcionalizado, todos los demás grupos funcionales se cubren opcionalmente con un reactivo de bloque adecuado para prevenir reacciones secundarias indeseadas.

En el caso de un hidrogel de HA que contiene un grupo maleimido funcionalizado, un compuesto que contiene tiol tal como mercaptoetanol es adecuado como agente bloqueante.

Esquema 1



5

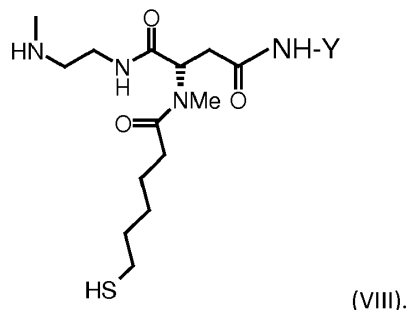
Otro aspecto de la presente invención son los intermedios funcionalizados que comprenden un conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón L^{2*}-L-Y.

Una realización del conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón L^{2*}-L-Y comprende una funcionalización tiol, que resulta en la fórmula

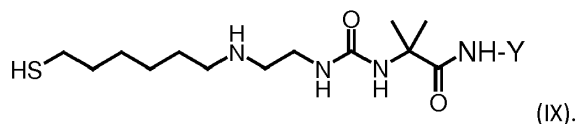
10 HS-L²-L-Y

en donde L², L e Y tienen los significados descritos anteriormente.

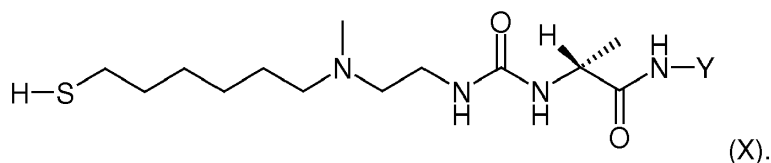
Una realización del conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón funcionalizado con tiol L^{2*}-L-Y es un conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón de fórmula (VIII)



5 Una realización del conjugado de agonista de enlazador de GLP-1/Glucagón funcionalizado con tiol L^{2*}-L-Y es un conjugado de agonista de enlazador de GLP-1/Glucagón de fórmula (IX)



10 Una realización del conjugado de agonista de enlazador de GLP-1/Glucagón funcionalizado con tiol L^{2*}-L-Y es un conjugado de agonista de enlazador de GLP-1/Glucagón de fórmula (X)



Composición farmacéutica

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

20 La composición del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel se puede proveer como una composición en suspensión o como una composición seca. En una realización, la composición farmacéutica del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel es una composición seca. Los métodos adecuados para secar son, por ejemplo, secado por pulverización y liofilización. Preferiblemente, la composición farmacéutica del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel se seca por liofilización.

En otra realización, la composición farmacéutica de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel es una suspensión lista para usar.

25 En otra realización, la composición farmacéutica de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel es una suspensión lista para usar en donde el profármaco se expande en agua/tampón hasta una concentración de 0,5 a 8 % (p/v).

En otra realización, la composición farmacéutica de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel es una suspensión lista para usar en donde el profármaco se expande en agua/tampón hasta una concentración de 1 a 4 % (p/v).

30 En otra realización, la composición farmacéutica del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel es una suspensión lista para usar en donde el profármaco se expande en agua/tampón hasta una concentración de 1,5 a 3 % (p/v).

35 Preferiblemente, el profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel se dosifica en forma suficiente en la composición como para proveer la cantidad terapéuticamente eficaz de agonista de GLP-1/Glucagón durante por lo menos tres días en una aplicación. Más preferiblemente, una aplicación del profármaco de hidrogel agonista de GLP-1/Glucagón es suficiente para una semana.

La composición farmacéutica del agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel de acuerdo con la presente invención contiene uno o más excipientes.

Los excipientes en las composiciones parenterales se pueden categorizar como agentes tampón, modificadores de isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes antiadsorción, agentes de protección contra oxidación, agentes potenciadores de viscosidad u otros agentes auxiliares. En algunos casos, estos ingredientes pueden tener funciones duales o triples. Las composiciones de profármacos de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel de acuerdo con la presente invención contienen uno o más de un excipiente, seleccionados de los grupos que consisten en:

(i) Agentes tampón: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un intervalo deseado, como fosfato de sodio, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden utilizar los antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad tampón se puede ajustar para satisfacer las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH

(ii) Modificadores de isotonicidad: para minimizar el dolor que puede provenir 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 por osimetría usando una osmolaridad supuesta de 285-315 mOsmol/kg para suero

(iii) Conservantes y/o antimicrobianos: las preparaciones parenterales de múltiples dosis requieren la adición de conservantes en una concentración suficiente para minimizar el riesgo de los pacientes de infectarse tras la inyección, y se han establecido requerimientos normativos. Los conservantes típicos incluyen m-cresol, fenol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato fenilmercúrico, timerosol, ácido sórbico, sorbato de potasio, ácido benzoico, clorocresol y cloruro de benzalconio

(iv) Estabilizantes: la estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas estabilizadoras de las proteínas, por desestabilización del estado desnaturalizado, o por unión directa de excipientes a la proteína. Los estabilizantes 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 (zinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas tal como derivados fenólicos. Además, se pueden usar oligómeros o polímeros, tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, PEG o PVP, o protamina o HSA

(v) Agentes anti-adsorción: principalmente tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles se utilizan para recubrir o adsorber en forma competitiva a la superficie interior del recipiente de la composición. P. ej., poloxámero (Pluronic F-68), PEG dodecil éter (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilenglicol, PEG-polihistidina, BSA y HSA, y gelatinas. La concentración y el tipo de excipientes seleccionados depende del efecto que se ha de evitar pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interface justo encima del valor CMC.

(vi) Lio- y/o crioprotectores: durante la liofilización o el secado por pulverización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizantes causados por la ruptura de lazos de hidrógeno y la eliminación de agua. Para este propósito, se pueden utilizar azúcares y polioles, pero también se han observado efectos positivos correspondientes para tensioactivos, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trehalosa es particularmente eficiente para reducir la agregación inducida por humedad y también mejora la estabilidad térmica potencialmente causada por la exposición de grupos hidrófobos de proteína a agua. Se pueden emplear también manitol y sacarosa, o bien como el único lio/crioprotector o en combinación uno con el otro, en donde se sabe que las relaciones superiores de manitol sacarosa mejoran la estabilidad física de una torta liofilizada. El manitol también se puede combinar con trehalosa. La trehalosa se puede combinar con sorbitol o el sorbitol se puede utilizar como el único protector. También se pueden utilizar almidón o derivados de almidón.

(vii) Agentes de protección contra oxidación: antioxidantes como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatona, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), propil galato, vitamina E, agentes quelantes como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico.

(viii) Mejoradores de viscosidad: retrasan el sedimentado de las partículas en el vial y la jeringa y se usan con el fin de facilitar el mezclado y la resuspensión de las partículas y hacer que la suspensión sea más fácil de inyectar (es decir, poca fuerza en el émbolo de la jeringa). Los mejoradores de viscosidad son, por ejemplo, mejoradores de viscosidad de carbómeros como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o dietilaminoetil celulosa (DEAE o DEAE-C), silicato de magnesio coloidal (Veegum) o silicato sódico, gel de hidroxipatita, gel de fosfato de tricalcio, xantanos, carrageninas como goma Satia UTC 30, poli (hidroxiácidos) alifáticos, como ácido poli(D,L- o L-láctico) (PLA) y ácido poli(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 componer un tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (p. ej., Pluronic®), copolímero de poliéster, tal como un copolímero de polietilenglicol tereftalato/polibutiltereftalato, sacarosa acetato isobutirato (SAIB), dextrano o sus derivados, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, quitosán, alcohol polivinílico (PVA) y derivados, polialquilimidias, poli (acrilamida-co-dialildimetil amonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glucosaminoglucanos (GAG) como sulfato

- de dermatán, sulfato de condroitina, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparán, hialuronano, copolímeros tribloque ABA o bloque AB compuestos por bloques A hidrófobos, como poliláctico (PLA) o poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) y bloques B hidrófilos, como polietilenglicol (PEG) o polivinil pirrolidona. Dichos copolímeros de bloque, además de los poloxámeros anteriormente mencionados, pueden exhibir conducta de gelación térmica (estado fluido a temperatura ambiente para facilitar la administración y la temperatura de transición del sol-gel y el estado de gel a temperatura corporal después de la inyección).
- (ix) Agente de propagación o difusión: modifica la permeabilidad del tejido conjuntivo a través de la hidrólisis de componentes de la matriz extracelular en el espacio intrasticial, como, sin limitarse a ello, ácido hialurónico, un polisacárido que se halla en el espacio intercelular del tejido conjuntivo. Un agente de propagación tal como, aunque sin limitarse a ello, hialuronidasa reduce temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular y promueve la difusión de los fármacos inyectados.
- (x) Otros agentes auxiliares: como humectantes, modificadores de viscosidad, antibióticos, hialuronidasa. Los ácidos y bases tales como ácido clorhídrico e hidróxido sódico son agentes auxiliares necesarios para el ajuste de pH durante la fabricación.
- En una realización, la composición del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele contiene uno o más agentes modificadores de viscosidad.
- En otra realización, la composición del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele contiene ácido hialurónico como agente modificador de viscosidad.
- En otra realización, la composición del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele comprende ácido hialurónico como agente modificador de viscosidad en una concentración de 5 a 30 % en peso.
- En otra realización, la composición del fármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele comprende ácido hialurónico como agente modificador de viscosidad de un peso molecular de 200 kDa a 6 millones de kDa.
- En otra realización la composición de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele comprende ácido hialurónico como agente modificador de viscosidad de un peso molecular de 500 kDa a 3 millones kDa.
- El término "excipiente" preferiblemente se refiere a un diluyente, adyuvante o vehículo con el cual se administra el compuesto terapéutico. Dicho excipiente farmacéutico puede consistir en líquidos estériles. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La disolución salina y la dextrosa acuosa son excipientes preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. 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, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede además contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente como para proveer la forma de administración correcta al paciente. La formulación se debe adecuar al modo de administración.
- En una realización general una composición farmacéutica de la presente invención, o bien en forma seca o como suspensión o en otra forma, se puede proveer como una composición de monodosis o de múltiples dosis.
- En una realización de la presente invención, la composición seca del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele se provee como monodosis, lo que significa que el envase en el que se provee contiene una sola dosis farmacéutica.
- Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, la composición se provee como una composición monodosis.
- En otro aspecto de la presente invención, la composición está comprendida en un recipiente. En una realización, el recipiente es una jeringa de cámara dual. Especialmente, la composición seca de acuerdo con la presente invención se provee en una primera cámara de la jeringa de cámara dual y la disolución para reconstitución se provee en una segunda cámara de la jeringa de la cámara dual.
- Antes de aplicar la composición seca de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele a un paciente que lo necesita, la composición seca se reconstituye. La reconstitución puede tener lugar en el recipiente en el que se provee la composición seca del profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogele, como en un vial, jeringa, jeringa de cámara dual, ampolla y cartucho. La reconstitución se realiza añadiendo una cantidad predefinida de disolución

- de reconstitución a la composición seca. Las disoluciones para reconstitución son líquidos estériles, como agua o tampón, que pueden contener otros aditivos, como conservantes y/o antimicrobianos. Si la composición de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel se provee como monodosis, la disolución para reconstitución puede contener uno o más conservantes y/o antimicrobianos. Preferiblemente, la disolución de reconstitución es agua estéril.
- 5
- Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al método de administración de una composición de profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel reconstituida. La composición de profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel se puede administrar por métodos de inyección o infusión, incluidos intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea e intraperitoneal.
- 10 Otro aspecto es un método para preparar una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde el agonista de GLP-1/Glucagón se une transitoriamente a un hidrogel, en donde el método comprende la etapa de
- poner en contacto la composición de la presente invención con una disolución para reconstitución.
- 15 Otro aspecto es una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde el agonista de GLP-1/Glucagón está transitoriamente unido a un hidrogel obtenible por el método anteriormente mencionado.
- Otro aspecto de la presente invención es el método para elaborar una composición seca de profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel. En una realización, dicha composición en suspensión se efectúa
- 20
- (i) mezclando el profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel con uno o más excipientes,
 - (ii) transfiriendo cantidades equivalentes a una monodosis o múltiples dosis en un recipiente adecuado,
 - (iii) secando la composición en dicho recipiente, y
 - (iv) sellando el recipiente.
- 25 Dichos recipientes son viales, jeringas, jeringas de cámara dual, ampollas y cartuchos.
- Otro aspecto es un kit de partes. Cuando el dispositivo de administración es simplemente una jeringa hipodérmica, entonces el kit puede comprender la jeringa, una aguja y un recipiente que comprende la composición de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel seca para uso con la jeringa y un segundo recipiente que comprende la disolución para reconstitución. En realizaciones más preferidas, el dispositivo para inyección es
- 30 distinto de una jeringa hipodérmica simple y entonces el recipiente separado con el profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel reconstituido se adapta para conectarse con el dispositivo de inyección de modo tal que en uso la composición líquida en el recipiente está en conexión fluida con la salida del dispositivo de inyección. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, entre otros, jeringas hipodérmicas y dispositivos de inyector de tipo bolígrafo. Los dispositivos de inyección particularmente preferidos son los inyectores de tipo bolígrafo en
- 35 cuyo caso el recipiente es un cartucho, preferiblemente un cartucho desechable.
- Un kit de partes preferido comprende una aguja y un recipiente que contiene la composición de acuerdo con la presente invención y opcionalmente también contiene una disolución para reconstitución, en donde el recipiente se adapta para uso con la aguja. Preferiblemente, el recipiente es una jeringa de cámara dual.
- 40 En otro aspecto, la invención da a conocer un cartucho que contiene una composición de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel como se mencionó anteriormente para uso como dispositivo inyector de tipo bolígrafo. El cartucho puede contener una monodosis o una multiplicidad de dosis de agonista de GLP-1/Glucagón.
- En una realización de la presente invención, la composición en suspensión de profármaco agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel no solamente comprende un profármaco de agonista de GLP-1/Glucagón-hidrogel y uno o más excipientes, sino también los agentes biológicamente activos, o bien en su forma libre o como profármacos.
- 45 Preferiblemente, dicho uno o más agentes biológicamente activos adicionales consisten en un profármaco, más preferiblemente un profármaco de hidrogel. Dichos agentes biológicamente activos incluyen, aunque sin limitarse a ello, compuestos de las siguientes clases:
- Inyectabilidad
- Preferiblemente, la formulación se puede administrar por inyección mediante una aguja de diámetro interno de
- 50 menos de 0,26 mm (Gauge 26), incluso más preferiblemente mediante una aguja de diámetro interno de menos de 0,18 mm (Gauge 28) y lo más preferiblemente mediante una aguja de diámetro interno de menos de 0,16 mm (Gauge 30).

Se ha de entender que las expresiones "se puede administrar por inyección", "inyectable" o "inyectabilidad" se refieren a una combinación de factores tales como cierta fuerza aplicada a un émbolo de una jeringa que contiene el hidrogel de HA biodegradable de acuerdo con la invención expandido en un líquido a una determinada concentración (p/v) y una determinada temperatura, una aguja de un diámetro interno determinado conectada a la salida de dicha jeringa, y el tiempo requerido para extruir un cierto volumen del hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención de la jeringa a través de la aguja.

Con el fin de proporcionar inyectabilidad, un volumen de 1 ml de los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón de acuerdo con la invención expandidos en agua y contenidos en una jeringa (que sostiene un émbolo de 4,7 mm de diámetro) se puede extruir a temperatura ambiente dentro de 10 segundos aplicando una fuerza igual/inferior a 20 Newton a través de una aguja de gauge 26.

Una inyectabilidad preferida es un volumen de 1 ml de los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón de acuerdo con la invención expandidos en agua y contenidos en una jeringa (que sostiene un émbolo de 4,7 mm de diámetro) que se puede extruir a temperatura ambiente dentro de 10 segundos aplicando una fuerza igual/inferior a 20 Newton a través de una aguja de gauge 30.

Sorprendentemente se descubrió que el vehículo de HA de la invención necesita menos fuerza para inyección cuanto mayor es la carga de péptido en el polímero (Fig. 5).

Con el fin de proveer inyectabilidad, un volumen de 1 ml de los profármacos agonistas de GLP-1/Glucagón de acuerdo con la invención expandidos en agua/tampón hasta una concentración de por lo menos 1,5% (p/v) y contenidos en una jeringa que sostiene un émbolo de 4,7 mm de diámetro se puede extruir a temperatura ambiente dentro de 10 segundos aplicando una fuerza de menos de 30 Newton a través de una aguja de gauge 30.

Más preferiblemente, se logra la inyectabilidad para un profármaco agonista de GLP-1/Glucagón de acuerdo con la invención expandido en agua/tampón hasta una concentración de por lo menos 2% (p/v) aplicando una fuerza de menos de 30 Newton a través de una aguja de gauge 30.

Lo más preferiblemente, se logra la inyectabilidad para un profármaco agonista de GLP-1/Glucagón de acuerdo con la presente invención expandido en agua/tampón hasta una concentración de por lo menos 2% (p/v) aplicando una fuerza de menos de 20 Newton a través de una aguja de gauge 30.

Una característica importante del profármaco es la formación de un depósito estable que permanece en su sitio de aplicación. La degradación del polímero debe comenzar después de la liberación del fármaco.

Terapia combinada

Los profármacos de la presente invención, agonistas duales para los receptores de GLP-1 y Glucagón, se pueden combinar ampliamente con otros compuestos farmacológicamente activos, como todos los fármacos mencionados en la Rote Liste 2015, p. ej., con todos los agentes de reducción de peso o supresores del apetito mencionados en la Rote Liste 2015, capítulo 1, todos los agentes reductores de lípidos mencionados en la Rote Liste 2015, capítulo 58, todos los hipertensivos y nefroprotectores mencionados en la Rote Liste 2015, o todos los diuréticos mencionados en la Rote Liste 2015, capítulo 36.

Las combinaciones del ingrediente activo se pueden usar especialmente para una mejora sinérgica de la acción. Se pueden aplicar o bien por administración separada de los ingredientes activos al paciente o en la forma de productos combinados en donde están presentes una pluralidad de ingredientes activos en una preparación farmacéutica. Cuando los ingredientes activos se administran por administración separada de los ingredientes activos, esto se puede hacer simultánea o sucesivamente.

La mayoría de los ingredientes activos mencionados en lo sucesivo se describen en USP Dictionary of USAN e International Drug Names, Farmacopea de EE. UU., Rockville 2011.

Otras sustancias activas que son adecuadas para dichas combinaciones incluyen en particular aquellas que, por ejemplo, potencian el efecto terapéutico de una o más sustancias activas con respecto a una de las indicaciones mencionadas y/o que permiten la administración de una o más sustancias activas a reducir.

Los agentes terapéuticos que son adecuados para combinaciones incluyen, por ejemplo, agentes antidiabéticos tales como:

Insulina y derivados de insulina, por ejemplo: Glargina / Lantus®, 270 - 330U/ml de insulina glargina (EP 2387989 A), 300U/ml de insulina glargina (EP 2387989 A), Glulisina / Apidra®, Detemir / Levemir®, Lispro / Humalog® / Liprolog®, Degludec / DegludecPlus, Aspart, insulina basal y análogos (p. ej., LY-2605541, LY2963016, NN1436), insulina PEGilada Lispro, Humulin®, Linjeta, SuliXen®, NN1045, Insulin plus Symlin, PE0139, insulinas de acción rápida y acción corta (p. ej., Linjeta, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002)hidrogel, insulinas orales, inhalables, transdérmica y sublinguales (p. ej., insulina oral Exubera®, Nasulin®, Afrezza, Tregopil, TPM 02, Capsulin, Oral-lyn®,

Cobalamin®, insulina oral ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab, Oshadi). También se incluyen los derivados de insulina que se unen a albúmina u otra proteína mediante un enlazador bifuncional.

5 GLP-1, análogos de GLP-1 y agonistas de los receptores de GLP-1, por ejemplo: Lixisenatida / AVE0010 / ZP10 / Lyxumia, Exenatida / Exendina-4 / Byetta / Bydureon / ITCA 650 / AC-2993, Liraglutida / Victoza, Semaglutida, Taspeglutida, Syncria / Albiglutida, Dulaglutida, rExendina-4, CJC-1134-PC, PB-1023, TTP-054, Langlenatida / HM-11260C, CM-3, GLP-1 Eligen, ORMD-0901, NN-9924, NN-9926, NN-9927, Nodexen, Viador-GLP-1, CVX-096, ZYOG-1, ZYD-1, GSK-2374697, DA-3091, MAR-701, MAR709, ZP-2929, ZP-3022, TT-401, BHM-034. MOD-6030, CAM-2036, DA-15864, ARI-2651, ARI-2255, Exenatida-XTEN y Glucagón-Xten.

10 Inhibidores de DPP-4, por ejemplo: Alogliptin / Nesina, Trajenta / Linagliptin / BI-1356 / Ondero / Trajenta / Tradjenta / Trayenta / Tradzenta, Saxagliptin / Onglyza, Sitagliptin / Januvia / Xelevia / Tesave / Janumet / Velmetia, Galvus / Vildagliptin, Anagliptin, Gemigliptin, Teneligliptin, Melogliptin, Trelagliptin, DA-1229, Omarigliptin / MK-3102, KM-223, Evogliptin, ARI-2243, PBL-1427, Pinoxacin.

15 Inhibidores de SGLT2, por ejemplo: Invokana / Canaglifozin, Forxiga / Dapaglifozin, Remoglifozin, Sergliflozin, Empaglifozin, Ipraglifozin, Tofogliflozin, Luseogliflozin, LX-4211, Ertuglifozin / PF-04971729, RO-4998452, EGT-0001442, KGA-3235 / DSP-3235, LIK066, SBM-TFC-039,

20 Biguanidas (p. ej., Metformina, Buformina, Fenformina), Tiazolidinadionas (p. ej., Pioglitazona, Rivoglitazona, Rosiglitazona, Troglitazona), agonistas de PPAR duales (p. ej., Aleglitazar, Muraglitazar, Tesaglitazar), Sulfoniureas (p. ej., Tolbutamida, Glibenclamida, Glimepirida/Amarilo, Glipizida), Meglitinidas (p. ej., Nateglinida, Repaglinida, Mitiglinida), inhibidores de Alfa-glucosidasa (p. ej., Acarbosa, Miglitol, Voglibosa), Amylin y análogos de Amylin (p. ej., Pramlintide, Symlin).

Agonistas de GPR119 (p. ej., GSK-263A, PSN-821, MBX-2982, APD-597, ZYG-19, DS-8500), agonistas de GPR40 (p. ej., Fasiglifam / TAK-875, TUG-424, P-1736, JTT-851, GW9508).

25 Otras parejas para combinación adecuadas son: Cycloset, inhibidores de 11-beta-HSD (p. ej., LY2523199, BMS770767, RG-4929, BMS816336, AZD-8329, HSD-016, BI-135585), activadores de glucocinasa (p. ej., TTP-399, AMG-151, TAK-329, GKM-001), inhibidores de DGAT (p. ej., LCQ-908), inhibidores de proteína tirosinafosfatasa 1 (p. ej., Trodusquemine), inhibidores de glucosa-6-fosfatasa, inhibidores de fructosa -1,6-bisfosfatasa, inhibidores de glucógeno fosforilasa, inhibidores de fosfoenol piruvato carboxinasa, inhibidores de glucógeno sintasa cinasa, inhibidores de piruvato deshidrocinasa, alfa2-antagonistas, CCR-2 antagonistas, inhibidores de SGLT-1 (p. ej., LX-2761).

30 Uno o más agentes de reducción de lípidos son también adecuados como parejas de combinación, tal como por ejemplo: inhibidores de HMG-CoA-reductasa (p. ej., Simvastatina, Atorvastatina), fibratos (p. ej., Bezafibrato, Fenofibrato), ácido nicotínico y sus derivados (p. ej., Niacina),

Agonistas o moduladores de PPAR-(alfa, gama o alfa/gama) (p. ej., Aleglitazar),

35 Agonistas de PPAR-delta, inhibidores de ACAT (p. ej., Avasimibe), inhibidores de absorción de colesterol (p. ej., Ezetimibe), sustancias de unión a ácido biliar (p. ej., colestiramina, colesevelam), inhibidores del transporte de ácido biliar ileal, inhibidores de MTP o moduladores de PCSK9.

Compuestos que elevan el HDL tales como: inhibidores de CETP (p. ej., Torcetrapib, Anacetrapid, Dalcetrapid, Evacetrapid, JTT-302, DRL-17822, TA-8995) o reguladores de ABC1.

40 Otras parejas de combinación adecuadas son una o más sustancias activas para el tratamiento de la obesidad, como por ejemplo: Sibutramina, Tesofensina, Orlistat, antagonistas del receptor canabinoide-1, antagonistas del receptor de MCH-1, agonistas del receptor de MC4, antagonistas de NPY5 o NPY2 (p. ej., Velnepirit), beta-3-agonistas, leptina o miméticos de leptina, agonistas del receptor de 5HT2c (p. ej., Lorcaserin), o las combinaciones de bupropiona/naltrexona, bupropiona/zonisamida, bupropiona/fentermina o pramlintida/metreleptina.

Otras parejas de combinación adecuadas son:

45 Otros péptidos gastrointestinales tales como el Péptido YY 3-36 (PYY3-36) o sus análogos, polipéptido pancreático (PP) o sus análogos.

Agonistas o antagonistas de los receptores de glucagón, agonistas o antagonistas del receptor de GIP, antagonistas de grelina o agonistas inversos, Xenin y sus análogos.

50 Asimismo, son adecuadas las combinaciones con fármacos para influir en la hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca crónica o aterosclerosis, como p. ej.: antagonistas de los receptores de angiotensina II (p. ej., telmisartán, candesartán, valsartán, losartán, eprosartán, irbesartán, olmesartán, tasosartán, azilsartán), inhibidores de ACE, inhibidores de ECE, diuréticos, beta-bloqueantes, antagonistas de calcio, hipertensivos de acción central, antagonistas del receptor alfa-2-adrenérgico, inhibidores de endopeptidasa neutra, inhibidores de agregación de trombocitos y otros o sus combinaciones.

Uso

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un profármaco de acuerdo con la invención o su sal fisiológicamente aceptable combinado con por lo menos una de las sustancias activas anteriormente descritas como una pareja de combinación, para preparar un medicamento adecuado para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones, uniéndose a los receptores de GLP-1 y Glucagón y modulando su actividad.

10 Dichas composiciones son para uso en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos conocidos como agonistas de GLP-1/Glucagón agonista y GLP-1/Glucagón agonista agonistas, por ejemplo, para el tratamiento y la prevención de hiperglucemia y para el tratamiento y la prevención de 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 de síndrome metabólico y/u obesidad y/o trastornos alimenticios, síndrome de resistencia a insulina, reducción del nivel de lípidos en plasma, reducción del riesgo cardíaco, reducción del apetito, reducción del peso corporal, etc.

Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de esteatosis hepática, preferiblemente enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

15 El uso de los profármacos de acuerdo con la invención o su sal fisiológicamente aceptable en combinación con una o más sustancias activas puede tener lugar en forma simultánea, separada o secuencial.

20 El uso del profármaco de acuerdo con la invención, o su sal fisiológicamente aceptable, en combinación con otra sustancia activa puede tener lugar en forma simultánea o en momentos escalonados, pero particularmente dentro de un espacio de tiempo corto. Si se administran simultáneamente, las dos sustancias activas se administran juntas al paciente; si se usan en momentos escalonados, las dos sustancias activas se administran al paciente dentro de un periodo de tiempo inferior o igual a 12 horas, pero particularmente inferior o igual a 6 horas.

25 En consecuencia, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un medicamento que comprende un profármaco de acuerdo con la invención o la sal fisiológicamente aceptable de dicho compuesto y por lo menos una de las sustancias activas anteriormente descritas como parejas de combinación, opcionalmente junto con uno o más vehículos y/o diluyentes inertes.

El compuesto de acuerdo con la invención, o su sal o solvato fisiológicamente aceptable, y la sustancia activa adicional con la que se ha de combinar pueden estar presentes juntos en una formulación, por ejemplo una suspensión, o pueden estar separados en dos formulaciones idénticas o distintas, por ejemplo el llamado kit de partes.

30 Se describe también en este documento un método para tratar, controlar, demorar o prevenir en un paciente mamífero, preferiblemente en un ser humano, que necesita tratamiento de una o más de las afecciones, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco descrito en este documento o una composición farmacéutica descrita en este documento o su sal farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos

35 Materiales y métodos

Las abreviaturas empleadas son las siguientes:

AA	aminoácido
AcOH	ácido acético
AcOEt	acetato de etilo
40 cAMP	adenosina monofosfato cíclico
Bn	bencilo
Boc	terc-butiloxicarbonilo
BOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio
BSA	albúmina de suero bovino
45 tBuq	butilo terciario
DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]undeceno
DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida

ES 2 759 752 T3

	DCM	diclorometano
	Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-etilo
	ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)3-metil-butilo
	DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
5	DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
	DMEM	medio de Eagle modificado de Dulbecco
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
10	DTT	DL ditioneitol
	EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EDT	etanoditiol
	EDTA	ácido etilendiamintetracético
	eq	equivalente estequiométrico
15	EtOH	etanol
	FBS	suero bovino fetal
	Fmoc	fluorenilmetiloxycarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	HBSS	Disolución salina balanceada de Hanks
20	HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
	HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
	HOSu	N-hidroxisuccinimida
	HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
25	HTRF	Fluorescencia homogénea resuelta en tiempo
	IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
	LC/MS	Cromatografía de líquidos/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	4-metoxitritilo
	MS	espectro de masas / espectrometría de masas
	MTBE	éter metil <i>terc.</i> -butílico
35	PM	peso molecular
	NHSN-	hidroxi succinimida
	Palm	palmitoílo

	iPrOH	2-propanol
	PBS	disolución salina tamponada con fosfato
	PEG	polietilenglicol
	PK	farmacocinética
5	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
	Phth	ftalimido
	RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
	rpm	rondas por minuto
	TA	temperatura ambiente
10	SEC	cromatografía de exclusión de tamaño
	TCEP	hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina
	TES	triethylsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
15	TMEDA	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
	Trt	trilito
	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra rendimiento
	UV	ultravioleta
20	V	volumen

Ejemplo 1

Síntesis general de los compuestos peptídicos

Materiales:

25 Se emplearon diferentes resinas de Rink-Amide, resina de (4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo, Merck Biosciences; resina de 4-[(2,4-Dimetoxifenil)(Fmoc-amino)metil]fenoxi acetamido metilo, Agilent Technologies) para la síntesis de amidas de péptido con cargas en el intervalo de 0,3-0,4 mmol/g.

30 Se adquirieron aminoácidos naturales protegidos con Fmoc de Protein Technologies Inc., Senn Chemicals, Merck Biosciences, Novabiochem, Iris Biotech, Nagase o Bachem. Se usaron los siguientes aminoácidos estándar durante la síntesis: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.

35 Además, los siguientes aminoácidos especiales se adquirieron de los mismos proveedores que anteriormente: Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-L-His(Boc)-OH (disponible como tolueno solvato) y Boc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Nle-OH, Fmoc-L-Met(O)-OH, Fmoc-L-Met(O2)-OH, Fmoc-(S)MeLys(Boc)-OH, Fmoc-(R)MeLys(Boc)-OH, Fmoc-(S)MeOrn(Boc)-OH y Boc-L-Tyr(tBu)-OH.

40 Las síntesis de péptidos de fase sólida se llevaron a cabo, por ejemplo, en un Sintetizador de Péptidos Prelude (Protein Technologies Inc) o en un sintetizador automático similar usando química Fmoc estándar y activación de HBTU/DIPEA. Se usó DMF como el disolvente. Desprotección: 20% piperidina/DMF por 2 x 2,5 min. Lavados: 7 x DMF. Acoplamiento 2:5:10 200 mM AA / 500 mM HBTU / 2M DIPEA en DMF 2 x por 20 min. Lavados: 5 x DMF.

Todos los péptidos que se habían sintetizado se escindieron de la resina con el cóctel de escisión de King que consistía en 82,5% TFA, 5% fenol, 5% agua, 5% tioanisol, 2,5% EDT. Los péptidos brutos luego precipitaron en dietil

ES 2 759 752 T3

o diisopropil éter, se centrifugaron y liofilizaron. Los péptidos se analizaron por HPLC analítica y se verificaron por espectrometría de masas ESI. Los péptidos en bruto se purificaron por el procedimiento de purificación HPLC preparativa convencional.

HPLC analítica / UPLC

5 Método A: detección a 215 nm

columna: Péptido Aeris, 3,6 µm, XB-C18 (250 x 4,6 mm) a 60 °C

disolvente: H₂O+0,1%TFA : ACN+0,1%TFA (flujo 1,5 ml/min)

gradiente: 90:10 (0 min) a 90:10 (3 min) a 10:90 (43 min) a 10:90 (48 min) a 90:10 (49 min) a 90:10 (50 min)

Método B: detección a 220 nm

columna: Zorbax, 5 µm, C18 (250 x 4.6 mm) a 25 °C

disolvente: H₂O+0,1%TFA : 90% ACN + 10% H₂O +0,1%TFA (flujo 1,0 ml/min)

gradiente: 100:0 (0 min) a 98:2 (2 min) a 30:70 (15 min) a 5:95 (20 min) a 0:100 (25 min) a 0:100 (30 min) a 98:2 (32 min) a 98:2 (35 min)

10 Método C1: detección a 210 - 225 nm, opcionalmente acoplado a un analizador de masas Waters LCT Premier, modo de ion positivo por electropulverización

columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH™ C18 1,7 µm (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+1%FA : ACN+1%FA (flujo 0,5 ml/min)

gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (1,80 min) a 80:20 (1,85 min) a 80:20 (3 min) a 60:40 (23 min) a 25:75 (23,1 min) a 25:75 (25 min) a 95:5 (25.1 min) a 95:5 (30 min)

Método C2: detección a 210 - 225 nm, opcionalmente acoplado a un analizador de masas Waters LCT Premier, modo de ion positivo por electropulverización

columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH™ C18 1.7 µm (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+1%FA : ACN+1%FA (flujo 0,6 ml/min)

gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (1 min) a 65:35 (2 min) a 65:35 (3 min) a 45:55 (23 min) a 25:75 (23.1 min) a 25:75 (25 min) a 95:5 (25.1 min) a 95:5 (30 min)

15 Método C3: detección a 210 - 225 nm, opcionalmente acoplado a un analizador de masas Waters LCT Premier, modo ion positivo por electropulverización

columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH™ C18 1,7µm (150 x 2,1 mm) a 50°C

disolvente: H₂O+1%FA : ACN+1%FA (flujo 1 ml/min)

gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (1 min) a 65:35 (2 min) a 65:35 (3 min) a 45:55 (20 min) a 2:98 (20.1 min) a 2:98 (25 min) a 95:5 (25.1 min) a 95:5 (30 min)

ES 2 759 752 T3

Método C4: detección a 210 - 225 nm, opcionalmente acoplado a un analizador de masas Waters LCT Premier, modo ion positivo por electropulverización

columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH™ C18 1,7 µm (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+1%FA : ACN+1%FA (flujo 1 ml/min)

gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (1,80 min) a 80:20 (1,85 min) a 80:20 (3 min) a 60:40 (23 min) a 2:98 (23,1 min) a 2:98 (25 min) a 95:5 (25,1 min) a 95:5 (30 min)

Método D: detección a 214 nm

columna: Waters X-Bridge C18 3,5 µm 2,1 x 150 mm

disolvente: H₂O+0.5%TFA : ACN (flujo 0,55 ml/min)

gradiente: 90:10 (0 min) a 40:60 (5 min) a 1:99 (15 min)

5

Método E: detección a 210 - 225 nm, opcionalmente acoplado a un analizador de masas Waters LCT Premier, modo ion positivo por electropulverización

columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH™ C18 1,7 µm (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+1%FA : ACN+1 %FA (flujo 0,9 ml/min)

gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (2 min) a 35:65 (3 min) a 65:35 (23,5 min) a 5:95 (24 min) a 95:5 (26 min) a 95:5 (30 min)

Procedimiento de purificación por HPLC preparativa general:

- 10 Los péptidos en bruto se purificaron o bien en un sistema Äkta Purifier System o en un sistema de HPLC semiprep. Jasco. Se usaron columnas de HPLC preparativa RP-C18 de distintos tamaños y con diferentes caudales dependiendo de la cantidad de péptido bruto a purificar. Se emplearon acetonitrilo + 0,05 a 0,1% TFA (B) y agua + 0,05 a 0,1% TFA (A) como eluyentes. Alternativamente, se usó un sistema tampón que consistía en acetonitrilo y agua con cantidades menores de ácido acético. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y liofilizaron para obtener el producto purificado, típicamente como sal de acetato o TFA.
- 15

Solubilidad y estabilidad –Pruebas de derivados de exendina-4

Antes de las pruebas de solubilidad y estabilidad de un lote de péptidos, se determinó su contenido. En consecuencia, se investigaron dos parámetros, su pureza (HPLC-UV) y la cantidad de carga de sal del lote (cromatografía iónica).

20 Ejemplo 2

Para pruebas de solubilidad, la concentración diana fue 1,0 mg/ml de compuesto puro. En consecuencia, las disoluciones de las muestras sólidas se prepararon en diferentes sistemas tampón con una concentración de 1,0 mg/ml del compuesto en base al contenido previamente determinado. Se efectuó HPLC-UV después de 2 h de agitación moderada del sobrenadante, que se obtuvo por 20 min de centrifugación a 4000 rpm.

- 25 La solubilidad se determinó luego por comparación con las áreas del pico de UV obtenidas con una disolución stock del péptido a una concentración de 2 mg/ml en agua pura o una cantidad variable de acetonitrilo (control óptico de que se haya disuelto todo el compuesto). Este análisis también sirvió como punto de partida (t₀) para las pruebas de estabilidad.

Ejemplo 3

- 30 Para pruebas de estabilidad, se conservó una alícuota del sobrenadante obtenido para solubilidad durante 7 días a 25°C o 40 °C. Después de ese curso de tiempo, la muestra se centrifugó durante 20 min a 4000 rpm y el sobrenadante se analizó con HPLC-UV.

Para determinación de la cantidad del péptido restante, se compararon las áreas del pico del compuesto diana a t0 y t7, resultando en "% péptido restante", siguiendo la ecuación

$$\% \text{ péptido restante} = [(\text{péptido de área del pico } t7) \times 100] / \text{péptido de área del pico } t0.$$

- 5 La cantidad de productos de degradación solubles se calculó a partir de la comparación de la suma de las áreas del pico de todas las impurezas observadas reducida por la suma de las áreas del pico observadas a t0 (es decir, para determinar la cantidad de especies relacionadas con el péptido recién formadas). Este valor se expuso en relación porcentual a la cantidad inicial de péptido a t0, siguiendo la ecuación:

$$\% \text{ productos de degradación soluble} = \{[\text{suma de impurezas del área del pico } t7) - (\text{suma de impurezas del área del pico } t0)] \times 100\} / \text{péptido del área del pico } t0$$

- 10 La diferencia potencial de la suma de "% péptido restante" y "% productos de degradación soluble" a 100% refleja la cantidad de péptido que no permaneció soluble ante condiciones de estrés siguiendo la ecuación

$$\% \text{ precipitado} = 100 - ([\% \text{ péptido restante}] + [\% \text{ productos de degradación soluble}])$$

Este precipitado incluye productos de degradación no soluble, polímeros y/o fibrilos, que se han extraído del análisis por centrifugación.

La estabilidad química se expresa como "% péptido restante".

- 15 Cromatografía aniónica

Instrumento: Dionex ICS-2000, pre/columna: Ion Pac AG-18 2 x 50 mm (Dionex)/AS18 2 x 250 mm (Dionex), eluyente: hidróxido sódico acuoso, flujo: 0,38 ml/min, gradiente: 0-6 min: 22 mM KOH, 6-12 min: 22-28 mM KOH, 12-15 min: 28-50 mM KOH, 15-20min: 22mM KOH, supresor: ASRS 300 2 mm, detección: conductividad.

Como método de HPLC/UPLC, se usó el método D o E.

- 20 Ejemplo 4: datos *in vitro* de los receptores de GLP-1 y Glucagón

Las potencias de los compuestos peptídicos en los receptores de GLP-1 y Glucagón se determinaron exponiendo células que expresan el receptor de Glucagón humano (hGlucagón R) o el receptor de GLP-1 humano (hGLP-1 R) a los compuestos mencionados en concentraciones en aumento y midiendo el cAMP formado como se describe en el ejemplo 27.

- 25 Los resultados se exponen en la Tabla 2:

Tabla 2. Valores CE50 de los derivados de exendina-4 en los receptores de GLP-1 y Glucagón (se indican en pM)

SEQ ID NO	CE50 hGLP-1R	CE50 hGlucagón-R	SEQ ID NO	CE50 hGLP-1R	CE50 hGlucagón-R
4	1,7	6,2	24	1,2	11,1
5	2,7	5,0	25	4,6	259,0
6	4,9	24,3	26	0,9	33,8
7	8,5	20,6	27	1,0	44,8
8	1,2	5,3	28	1,1	57,7
9	1,5	35,6	29	0,4	21,3
10	1,6	47,5	30	0,5	10,9

ES 2 759 752 T3

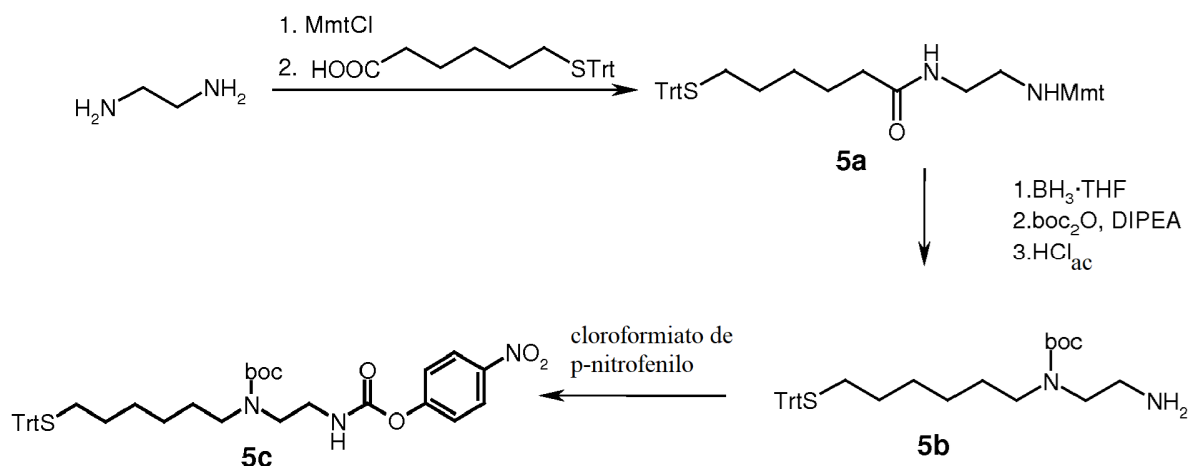
SEQ ID NO	CE50 hGLP-1R	CE50 hGlucagón-R	SEQ ID NO	CE50 hGLP-1R	CE50 hGlucagón-R
11	0,9	68,0	31	0,6	24,6
12	1,0	35,6	32	1,2	29,8
13	1,4	44,9	33	2,5	94,1
14	1,6	77,5	34	1,1	41,5
15	1,0	18,3	35	1,0	555,0
16	3,7	8,2	36	1,0	581,0
17	6,0	10,1	37	1,4	58,1
18	2,6	7,9	38	0,8	11,5
19	1,7	4,7	39	1,0	401,0
20	0,8	26,7	40	3,5	12,1
21	1,9	8,9	41	2,2	25,7
22	4,4	26,1	43	2,0	53,9
23	1,2	3,9	44	1,8	20,0
45	2,1	7,9	46	2,4	8,0
47	5,3	13,4	48	2,1	10,0
49	1,8	6,5	50	1,8	4,2
51	2,3	3,7	52	2,1	4,2
53	2,4	10,5	54	1,4	7,7
55	2,4	10,5	56	1,9	9,4
57	1,4	4,7	58	1,4	11,5
59	n.a.	n.a.	60	1,8	6,5

Síntesis del enlazador

Ejemplo 5

Síntesis del reactivo enlazador 5c

5 Se sintetizó el reactivo enlazador 5c de acuerdo con el siguiente esquema:



Síntesis del intermedio del reactivo enlazador 5a:

Se disolvió cloruro de m-metoxitritilo (3 g, 9,71 mmol) en DCM (20 ml) y se añadió gota a gota 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 de NaOH 0,1 M (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El intermedio protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol) se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

El intermedio protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol) se disolvió en DCM anhidro (30 ml). Se añadieron 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 TA. La disolución se diluyó con éter dietílico (250 ml) y se lavó tres veces con 30/1 (v/v) salmuera/disolución de NaOH 0,1 M (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se eliminaron a presión reducida. Se purificó 5a por cromatografía ultrarrápida.

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

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

Síntesis del intermedio del reactivo enlazador 5b:

A una disolución de 5a (3,19 g, 4,53 mmol) en THF anhidro (50 ml) se le añadió $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (disolución 1 M, 8,5 ml, 8,5 mmol) y la disolución se agitó durante 16 h a TA. Luego se añadió $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (disolución 1 M, 14 ml, 14 mmol) y se agitó durante 16 h a TA. La reacción se inactivó por adición de metanol (8,5 ml). Se añadió *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 TA y luego se diluyó con acetato de etilo (300 ml), se lavó con disolución saturada acuosa de Na_2CO_3 (2 x 100 ml) y disolución saturada acuosa de NaHCO_3 (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se eliminaron a presión reducida para obtener el intermedio de amina bruta (3,22 g).

El intermedio de amina (3,22 g) se disolvió en DCM (5 ml). Se añadieron 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 TA durante 30 min. La mezcla se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener el intermedio bruto protegido con Boc y Mmt (3,00 g). MS: m/z 791,4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 519,3 = $[\text{M}-\text{Mmt}+\text{H}]^+$ (PM calculado = 791,1).

Se añadió HCL acuoso 0,4 M (48 ml) a una disolución del intermedio protegido con Boc y Mmt en acetonitrilo (45 ml). La mezcla se diluyó con acetonitrilo (10 ml) y se agitó durante 1 h a TA. Posteriormente, se ajustó el valor del pH de la mezcla de reacción hasta 5,5 por adición de disolución de NaOH 5 M. Se eliminó el acetonitrilo a presión reducida y la disolución acuosa se extrajo con DCM (4 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y los volátiles se eliminaron a presión reducida. Se usó 5b bruto en la etapa siguiente sin purificación adicional. Rendimiento: 2,52 g (3,19 mmol).

MS: m/z 519,3 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (PM calculado = 519,8 g/mol).

Síntesis del reactivo enlazador 5c:

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

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

MS m/z 706.3 = [M+Na]⁺ (PM calculado = 706,3).

Síntesis del reactivo enlazador del péptido

a) Síntesis peptídica

5 La síntesis de péptidos de fase sólida se llevó a cabo, por ejemplo, en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies Inc) o sintetizador automático similar usando química de Fmoc convencional y activación de HBTU/DIPEA. Se usó DMF como el disolvente. Desprotección: 20% piperidina/DMF por 2 x 2,5 min. Lavados: 7 x DMF. Acoplamiento 2:5:10 200 mM AA / 500 mM HBTU / 2M DIPEA en DMF 2 x durante 20 min. Lavados: 5 x DMF.

b) Estiramiento N-terminal con D-Ala

10 Se dividió en cinco porciones iguales 0,9 mmol de péptido unido a resina (equivalente a 4 g de resina) sintetizado como se describe en la etapa a con un grupo amino libre en el término N. Cada porción se suspendió en 15 ml de DMF y luego se añadieron 2,5 eq. de Fmoc-D-Ala-OH, 2,5 eq. de HATU, 2,5 eq. de HOAt y 2,5 eq. de DIPEA. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción se eliminó por filtración, y la resina se lavó 3 veces con 18 ml de DMF, 18 ml de DCM, 18 ml de iso-propanol, 18 ml de éter dietílico. Los disolventes restantes se eliminaron al vacío.

15 c) Desprotección de Fmoc, sujeción del enlazador y escisión

Se dividió en dos porciones iguales 0,37 mmol péptido unido a resina (equivalente a 1,6 g de resina) sintetizado como se describe en la etapa b con un grupo amino libre en el término N. Cada porción se suspendió en 12 ml de una disolución al 20 % de piperidina en DMF y se agitó durante 5 min. El disolvente se eliminó y el procedimiento se repitió dos veces.

20 El péptido unido a resina se lavó 5 veces con 12 ml de DMF.

25 Luego la resina se suspendió en 10 ml DMF y se añadieron 2,5 eq. de (2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)amino)etil)(6-(trilitio)hexil)carbamato de terc-butilo 5c y 2,5 eq. DIPEA. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción se eliminó por filtración y la resina se lavó 3 veces con 15 ml DMF, 15 ml DCM, 15 ml iso-propanol, 15 ml éter dietílico. Los disolventes restantes se eliminaron al vacío. La reacción se ensayó para completar una prueba de Kaiser

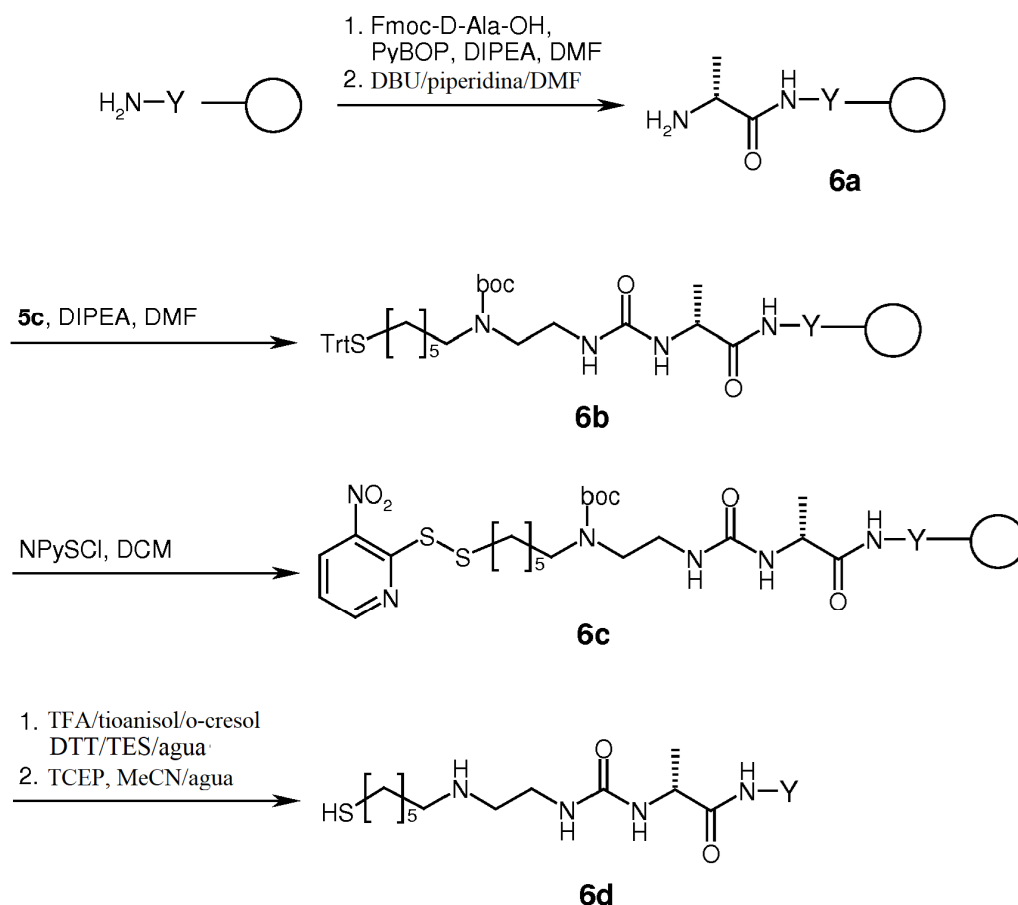
Luego se añadió una mezcla de TFA/DTT/TIS/H₂O/tioanisol/Bu₄NBr (100/3/2/3/1/0,05) y la mezcla se agitó durante 3,5 h. La mezcla se filtró y la resina se lavó con 1 ml TFA. Los filtrados combinados se añadieron a 100 ml de éter dietílico enfriado. El precipitado se aisló por centrifugación y se lavó 2 veces con 100 ml de éter dietílico.

30 El producto bruto se purificó por HPLC preparativa en una columna Waters (XBridge, BEH130, Prep C18 5 μM) usando un gradiente de acetonitrilo/agua (ambos tampones con 0,1% TFA). El intermedio purificado se liofilizó de inmediato y se conservó en una atmósfera de Ar o se usó directamente en la etapa siguiente.

Ejemplo 6

Síntesis del reactivo enlazador del agonista de GLP-1/Glucagón 6d (enlazador Ala)

El reactivo enlazador del agonista de GLP-1/Glucagón 6d se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



Síntesis del intermedio del reactivo enlazador del antagonista de GLP-1/Glucagón 6a:

- 5 El agonista de GLP-1/Glucagón protegido con cadena lateral con el término N libre en la resina (2,00 g, 0,2 mmol, carga aproximadamente 0,1 mmol/g) se transfirió a una jeringa de 20 ml equipada con una frita de filtro. Se extrajeron 8 ml de DMF anhidra en la jeringa, y la jeringa se agitó (600 rpm) durante 15 min con el fin de pre-expandir la resina. El disolvente se desechó y se extrajo 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 anhidra (4 ml) en la jeringa. La jeringa se agitó a TA y a 600 rpm durante 60 min. La disolución se desechó, y la resina se lavó diez veces con DMF.

La desprotección con Fmoc se realizó como se describió previamente.

- 10 Síntesis del intermedio del reactivo enlazador del agonista de GLP-1/Glucagón 6b:

Una disolución de 5c (137 mg, 0,4 mmol) en DMF anhidra (3 ml) se añadió a la resina 6a (0,2 mmol), seguida de una disolución de DIPEA (80 μ l, 0,46 mmol) en DMF anhidra (4,5 ml), y la mezcla de reacción se agitó (600 rpm) a 22°C durante 15 horas.

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

- 15 Síntesis del intermedio del reactivo enlazador del agonista de GLP-1/Glucagón 6c:

Se dispuso 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 extrajo DCM anhidro (4 ml) en la jeringa y la mezcla se agitó (600 rpm) a TA. Después de 2 h, la disolución se desechó y la resina se lavó 14 veces con DCM y se secó al vacío.

Síntesis del intermedio del reactivo enlazador del agonista de GLP-1/Glucagón 6d:

- 20 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 añadió 6c (0,15 mmol, 1,5 g) a la disolución agitada (250-350 rpm) a TA con el fin de obtener una suspensión homogénea. Se siguió agitando durante 45 min. La disolución se separó de las perlas de resina por filtración, las perlas se lavaron con TFA dos veces (2 ml cada vez) y las disoluciones de lavado se combinaron con el filtrado. Se eliminó TFA de las disoluciones combinadas en una corriente de nitrógeno.

Precipitó 6d bruto de la disolución concentrada (aprox. 10 ml) por adición de éter dietílico (30 ml) y agitación vigorosa. Después de centrifugar (2 min, 5000 rpm), el sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con éter dietílico dos veces (20 ml cada vez).

- 5 El precipitado seco se disolvió en una disolución de TCEP (114 mg, 0,39 mmol) en 30 ml 1/19 (v/v) acetonitrilo/agua que contenía 0,01 % TFA (v/v). La mezcla se incubó durante 15 horas a TA. Se purificó 6d por RP-HPLC como se describe en Materiales y métodos usando una columna de 150 x 30 mm Waters XBridge™ BEH300 C18 10 µm y un caudal de 40 ml/min.

- 10 Se cargaron hasta 12 ml de la mezcla en la columna. La elución se efectuó usando un gradiente lineal de 5% a 30% disolvente B (5 min) seguido de un gradiente lineal de 30% a 35% disolvente B (40 min). Las fracciones que contenían el producto 6d se mezclaron y liofilizaron. Pureza: 86 % (215 nm)

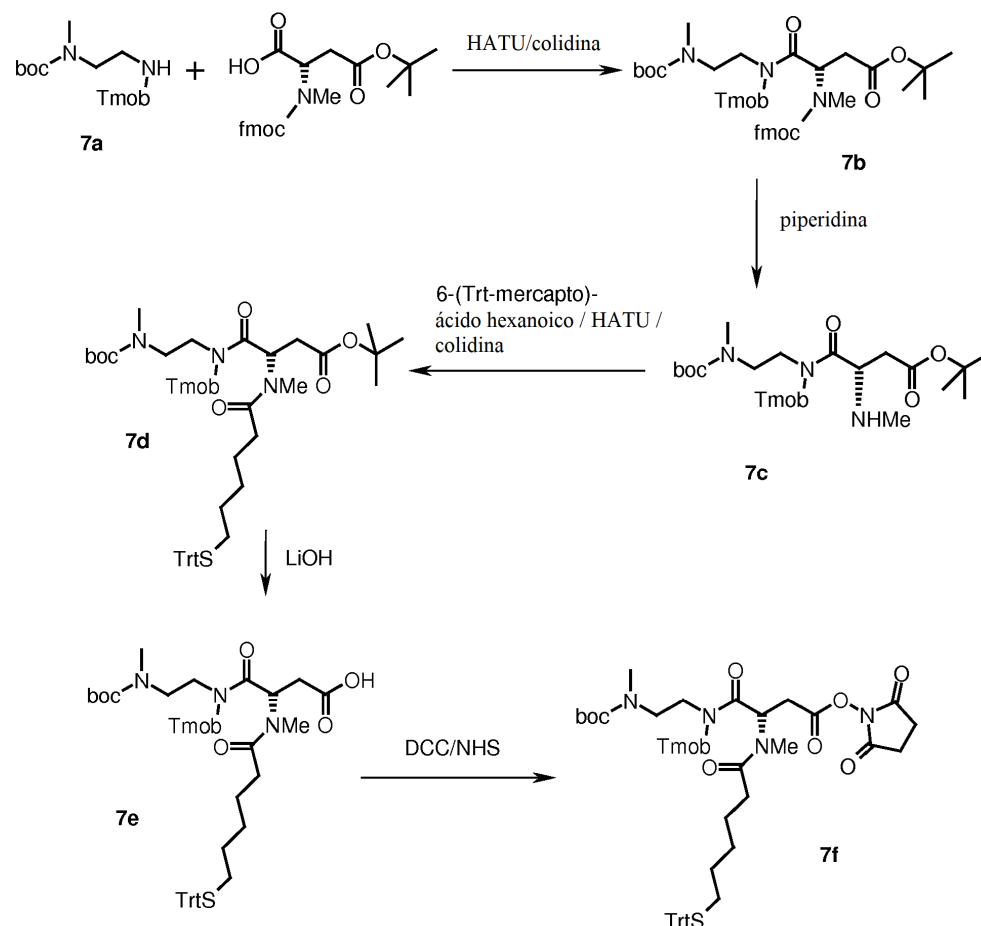
Rendimiento: 85,2 mg (19,2 µmol, comenzando por 2,00 g de resina).

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

Ejemplo 7 (enlazador Asn)

Síntesis del reactivo enlazador 7f

- 15 Se sintetizó el reactivo enlazador 7f de acuerdo con el siguiente esquema:



- 20 A una disolución enfriada (0 °C) de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (0,5 ml, 2,79 mmol) y NaCNBH₃ (140 mg, 2,23 mmol) en MeOH (10 ml) y ácido acético (0,5 ml) se le añadió una disolución de 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (0,547 mg, 2,79 mmol) en EtOH (10 ml). La mezcla se agitó a TA durante 2 h, se acidificó con HCl 2 M (1 ml) y se neutralizó con Na₂CO₃ saturado acuoso (50 ml). La evaporación de todos los volátiles, la extracción de DCM de la suspensión acuosa resultante y la concentración de las fracciones orgánicas proporcionaron *N*-Metil-*N*-boc-*N*'-tmob-etilendiamina (7a) en la forma de un aceite bruto que se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 593 mg (1,52 mmol)

MS: m/z 377,35 = [M+Na]⁺, (calculado = 377,14).

Se disolvió *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(*O**t*Bu)-OH (225 mg, 0,529 mmol) en DMF (3 ml) y se añadieron 7a (300 mg, 0,847 mmol), HATU (201 mg, 0,529 mmol) y colidina (0,48 ml, 3,70 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 2 h para dar 7b. Para desprotección de fmoc, se añadió piperidina (0,22 ml, 2,16 mmol) y se siguió agitando durante 1 h. Se añadió ácido acético (1 ml), y se purificó 7c por RP-HPLC.

5 Rendimiento: 285 mg (0,436 mmol como sal de TFA)

MS: m/z 562,54 = $[M+Na]^+$, (calculado = 562,67).

10 Se disolvió ácido 6-tritilmercaptohexanoico (0,847 g, 2,17 mmol) en DMF anhidra (7 ml). Se añadieron HATU (0,825 g, 2,17 mmol) y colidina (0,8 ml, 6,1 mmol) y 7c (0,78 g, 1,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 min a TA, se acidificó con AcOH (1 ml) y se purificó por RP-HPLC. Las fracciones con el producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa remanente se extrajo con DCM y se aisló 7d tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 1,4 g (94%)

MS: m/z 934,7 = $[M+Na]^+$, (calculado = 934,5).

15 A una disolución de 7d (1,40 mg, 1,53 mmol) en MeOH (12 ml) y H_2O (2 ml) se le añadió LiOH (250 mg, 10,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 14 h a 70 °C. La mezcla se acidificó con AcOH (0,8 ml) y se purificó 7e por RP-HPLC. Las fracciones con el producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa se extrajo con DCM y se aisló 7e tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 780 mg (60 %)

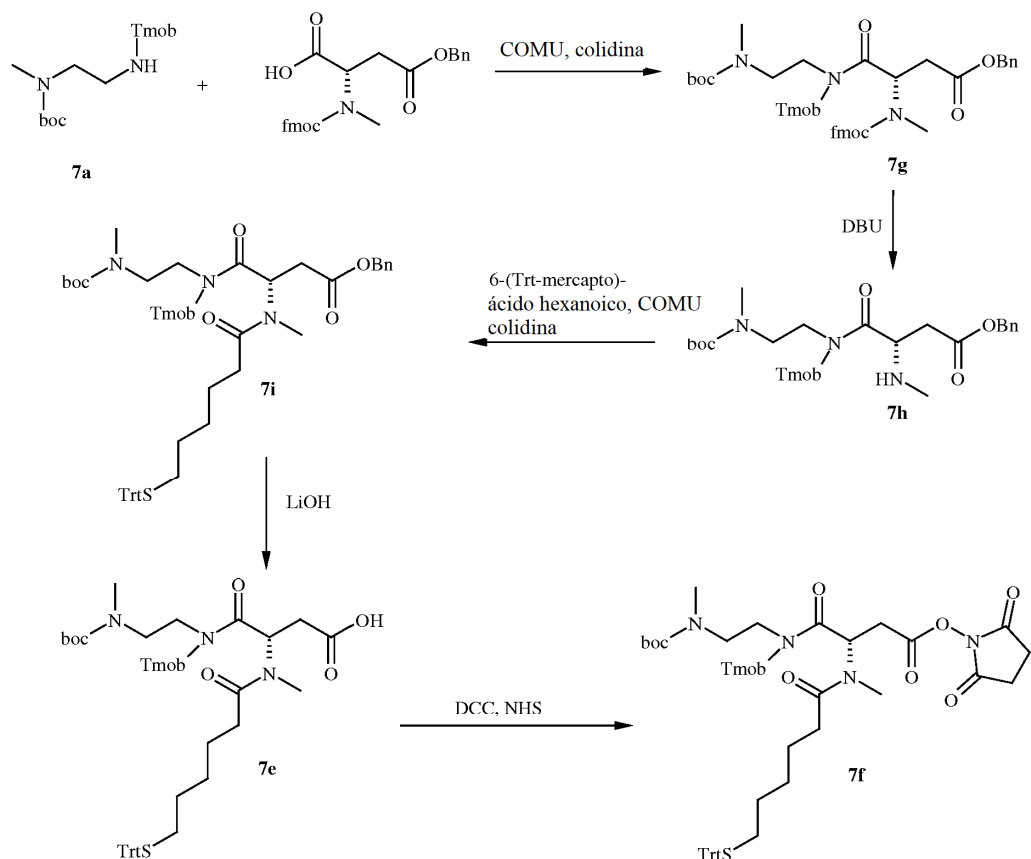
MS: m/z 878,8 = $[M+Na]^+$, (calculado = 878,40).

20 A una disolución de 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 ml) se le añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y *N*-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se filtró, y el filtrado se acidificó con AcOH 0,5 ml y se purificó 7f por RP-HPLC. Las fracciones con el producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa remanente se extrajo con DCM y se aisló 7f tras la evaporación del disolvente.

25 Rendimiento: 154 mg (0,161 mmol)

MS: m/z 953,4 = $[M+H]^+$, (calculado = 953,43).

Alternativamente, el reactivo enlazador 7f se sintetizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: esquema de reacción alternativo:



5 A una disolución de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (2 g, 11,48 mmol) y NaCNBH₃ (819 mg, 12,63 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (2,08 mg, 10,61 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a TA durante 90 min, se acidificó con HCl 3 M (4 ml) y se agitó otros 15 min. La mezcla de reacción se añadió a disolución saturada de NaHCO₃ (200 ml) y se extrajo 5 x con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y los disolventes se evaporaron al vacío. La *N*-Metil-*N*-boc-*N'*-tmob-etilendiamina (7a) resultante se secó por completo en alto vacío y se usó en la etapa de reacción siguiente sin purificación adicional.

Rendimiento: 3,76 g (11,48 mmol, 89 % pureza, 7a : producto doblemente protegido con Tmob = 8 :1)

MS: m/z 355,22 = [M+H]⁺, (calculado = 354,21)

10 A una disolución de 7a (2 g, 5,65 mmol) en CH₂Cl₂ (24 ml), se le añadieron COMU (4,84 g, 11,3 mmol), *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH (2,08 g, 4,52 mmol) y colidina (2,65 ml, 20,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a TA, se diluyó con CH₂Cl₂ (250 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el residuo se concentró hasta un volumen de 24 ml. Se purificó 7g usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 5,31 g (148 %, 6,66 mmol)

MS: m/z 796,38 = [M+H]⁺, (calculado = 795,37)

15 A una disolución de 7g [5,31 g, máx. 4,51 mmol ref. a *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH] en THF (60 ml), se le añadió DBU (1,8 ml, 3 % v/v). La disolución se agitó durante 12 min a TA, se diluyó con CH₂Cl₂ (400 ml) y se lavó 3 x con M H₂SO₄ 0,1 M (150 ml) y 3 x con salmuera (150 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. Se aisló 7h tras la evaporación del disolvente y se usó sin purificación adicional.

ES 2 759 752 T3

MS: m/z 574,31 = [M+H]⁺, (calculado = 573,30)

5 Se disolvió 7h (5,31 g, 4,51 mmol, bruto) en acetonitrilo (26 ml) y se añadieron COMU (3,87 g, 9,04 mmol), ácido 6-Tritilmercaptohexanoico (2,12 g, 5,42 mmol) y colidina (2,35 ml, 18,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a TA, se diluyó con CH₂Cl₂ (400 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se aisló 7i tras la evaporación del disolvente. El producto 7i se purificó usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 2,63 g (62 %, 94 % pureza)

MS: m/z 856,41 = [M+H]⁺, (calculado = 855,41)

10 A una disolución de 7i (2,63 g, 2,78 mmol) en *i*-PrOH (33 ml) y H₂O (11 ml) se le añadió LiOH (267 mg, 11,12 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 70 min a TA. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (200 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (50 ml) y 3 x con salmuera (50 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se aisló 7e tras la evaporación del disolvente. Se purificó 7j usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 2,1 g (88 %)

MS: m/z 878,4 = [M+Na]⁺, (calculado = 878,40)

15 A una disolución de 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 ml) se le añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de 5 min, se añadió *N*-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, el disolvente se eliminó al vacío y el residuo se recogió en 90 % acetonitrilo más 0,1 % TFA (3,4 ml). La mezcla bruta se purificó por RP-HPLC. Las fracciones que contenían el producto se neutralizaron con tampón de fosfato 0,5 M pH 7,4 y se concentraron. La fase acuosa remanente se extrajo con DCM y se aisló 7f tras la evaporación del disolvente.

20

Rendimiento: 154 mg (81 %)

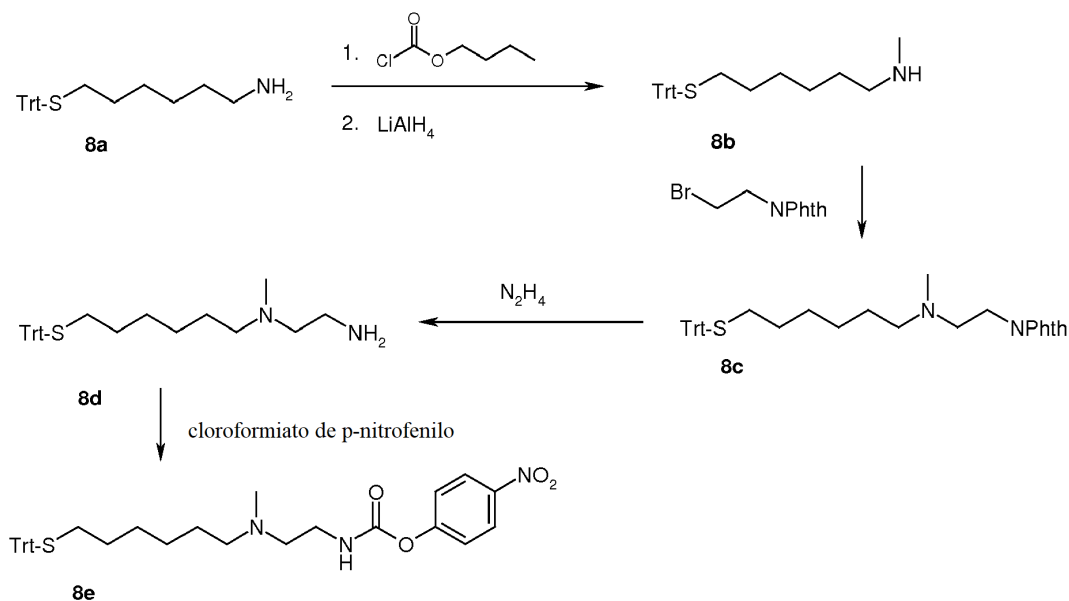
MS: m/z 953,4 = [M+H]⁺, (calculado = 953,43)

Ejemplo 8

Síntesis del reactivo enlazador 8e

Se sintetizó el reactivo enlazador 8e de acuerdo con el siguiente esquema:

ES 2 759 752 T3



La síntesis del intermedio del reactivo enlazador 8b se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. Se enfrió una disolución de amina 8a (1,69 g, 4,5 mmol, para preparación ver la publicación internacional WO-A 2009/133137) en 30 ml THF (seco, tamiz mol.) a 0 °C. Se añadieron cloroformiato de butilo (630 µl, 4,95 mmol) en 3 ml THF (seco, tamiz mol.) y DIPEA (980 µl, 5,63 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a 0 °C, se retiró el enfriamiento y la mezcla se agitó por otros 20 min a TA. Se añadió LiAlH₄ 1 M en THF (9 ml, 9 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo durante 1,5 h. La reacción se inactivó por adición lenta de metanol (11 ml) y 100 ml de disolución sat. de tartrato de Na/K. 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 8b (1,97 g) se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

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

Una disolución del producto bruto 8b (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 añadieron 60 ml de una disolución sat. de NaHCO₃ y la mezcla se extrajo 3 x con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se purificó ftalimida 8c sobre sílice usando heptano (que contenía 0,02 % NEt₃) y una cantidad ascendente de acetato de etilo (que contenía 0,02 % NEt₃) como eluyentes. Rendimiento: 0,82 g (1,46 mmol)

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

Se disolvió ftalimida 8c (819 mg 1,46 mmol) en 35 ml etanol y se añadió hidrato de hidrazina (176 µl, 3,64 mmol). La mezcla se sometió a reflujo durante 3 h. El precipitado se separó por filtración. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trató con 15 ml de diclorometano. El precipitado se separó por filtración y se eliminó el diclorometano a presión reducida. El residuo se purificó por RP HPLC. Las fracciones de HPLC combinadas se ajustaron hasta pH 7 añadiendo NaHCO₃ y se extrajeron varias veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar la amina 8d.

Rendimiento: 579 mg (1,34 mmol)

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

Se disolvió cloroformiato de para-nitrofenilo (483 mg, 2,40 mmol) en 10 ml de diclorometano (seco, tamiz mol.). Se añadieron una disolución de amina 8d (1,00 g, 2,31 mmol) en 5 ml diclorometano (seco, tamiz mol.) y 1,8 ml de simcolidina, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Se eliminó el diclorometano a presión reducida, el residuo se acidificó con ácido acético y se purificó por RP-HPLC para dar carbamato de para-nitrofenilo 8e.

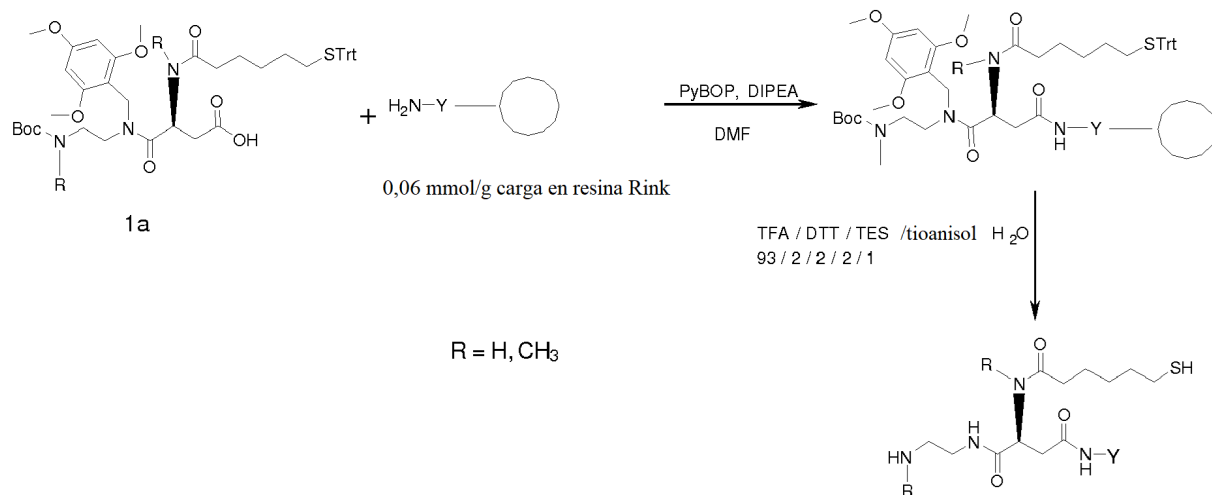
30 Rendimiento: 339 mg (0,57 mmol)

MS: m/z 598,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 597,8).

Síntesis de los conjugados de péptido-enlazador-polímero

Ejemplo 9

La síntesis del enlazador de tiol del agonista de GLP/Glucagón 1 se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente esquema:



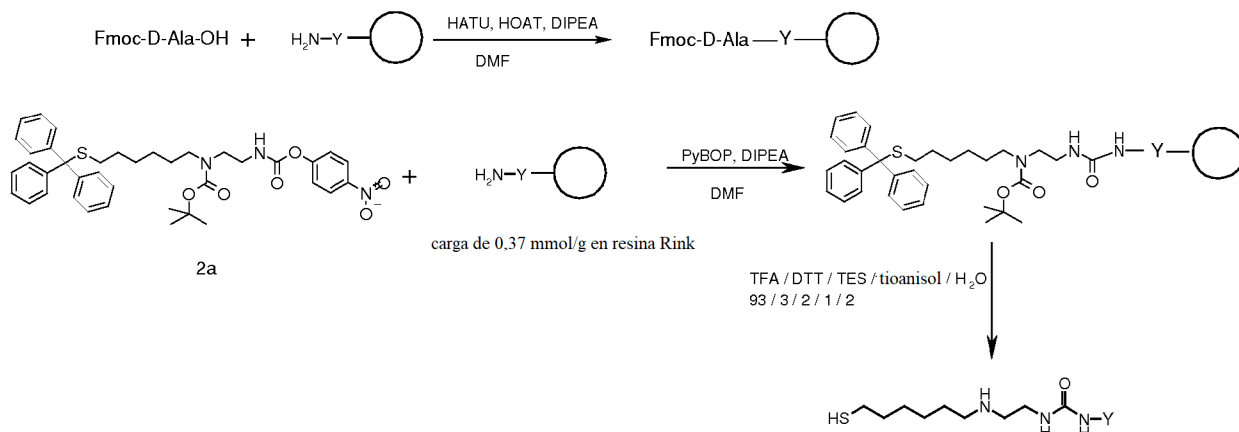
5 A 400 mg de la exendina-4 protegida con Fmoc unida a resina Seq. ID. 26 en resina rink en un recipiente para síntesis de péptidos se le añadieron 4 ml de 20% piperidina en DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. El procedimiento se repitió tres veces. El péptido unido a resina se lavó subsiguientemente con 4 ml de DMF tres veces.

10 A 80 mg (2,5 eqv.) del enlazador 1a y 60 mg (3,0 eqv.) de PyBOP se le añadieron 5 ml de DMF anhidra. A esta disolución se le añadieron 16 µl (3,0 eqv.) de diisopropildietiamina (DIPEA). La disolución resultante se añadió a la Exendina-4 unida a resina anteriormente procesada Seq ID. 3126-resina. La mezcla se dejó proceder durante 18 h. a 25°C. Al final de este periodo, la resina se filtró y se lavó con DMF anhidra (5 ml x 5), diclorometano (5 ml x 5), isopropanol (5 ml x 5) y éter dietílico (5 ml x 5).

15 El conjugado de péptido unido a resina-enlazador se trató con 10 ml de una disolución que contenía ácido trifluoroacético (TFA) / trietilsilano (TES) / ditiotretiol (DTT) / Tioanisol / agua (100/2/3/1/2). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 3 h. Al final de la reacción, el disolvente se separó por filtración y la resina se lavó con diclorometano (5 x 10 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se vertió en 50 ml de éter enfriado con hielo. Precipitó un sólido blanco. La mezcla se centrifugó y decantó. El sólido se lavó con éter dietílico (2 X 20 ml). El péptido-enlazador se purificó por HPLC de fase inversa (columna 30 x 100 mm C18, 25-40% AcCN / H₂O c/ 0,1% TFA en 20 min.). Las fracciones apropiadas se recogieron y evaporaron hasta sequedad proporcionando 16 mg del producto deseado en la forma de un sólido blanco. El producto se identificó por espectrometría de masas (pico de iones moleculares, m/z 1469, z=3).

Ejemplo 10

El enlazador tiol de GLP/Glucagón 2 se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



A 1,8 g de la Exendina-4 protegida por Fmoc unida a resina Seq ID. 26 en resina rink en un recipiente para síntesis de péptidos se le añadieron 20 ml de 20% piperidina en DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. El procedimiento se repitió tres veces. El péptido unido a resina se lavó posteriormente con 20 ml de DMF tres veces.

5 A 163 mg (2,5 eqv.) Fmoc-D-Ala-OH, 199 mg (2,5 eqv.) de HATU y 71 mg (2,5 eqv.) de HOAt se le añadieron 15 ml de DMF anhidra. A esta disolución se le añadieron 92 μ l (2,5 eqv.) de diisopropildietamina (DIPEA). La disolución resultante se añadió a la exendina-4 unida a la resina anteriormente procesada Seq ID. 26. La mezcla se dejó proceder durante 16 h. a 25°C. Al final de este periodo, la resina se filtró y se lavó con DMF anhidro (20 ml x 5), diclorometano (20 ml x 5), isopropanol (20 ml x 5) y éter dietílico (20 ml x 5).

10 A la D-Ala-exendina-4 protegida con Fmoc unida a resina Seq ID. 26 en resina rink en un recipiente para síntesis de péptidos se le añadieron 15 ml de 20% piperidina en DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. El procedimiento se repitió tres veces. El péptido unido a resina se lavó posteriormente con 15 ml de DMF tres veces.

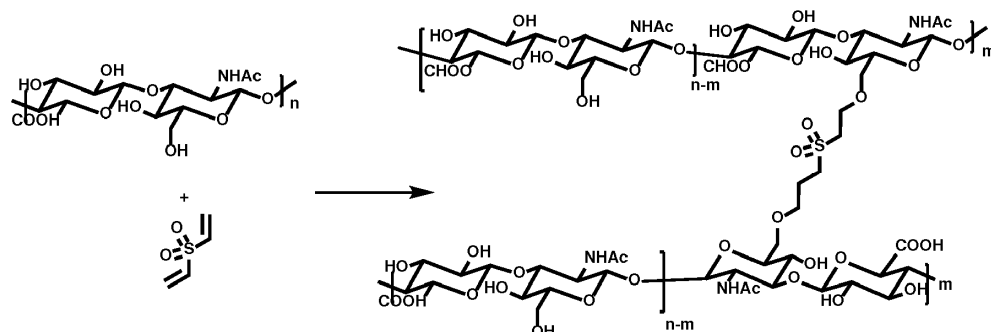
15 A 352 mg (2,5 eqv.) del enlazador 2a se le añadieron 15 ml de DMF anhidra. A esta disolución se le añadieron 92 μ l (2,5 eqv.) de diisopropildietamina (DIPEA). La disolución resultante se añadió a la D-Ala-Exendina-4 unida a resina Seq ID. 26 – en resina. La mezcla se dejó proceder durante 16 h a 25°C. Al final de este periodo, la resina se filtró y se lavó con DMF anhidra (15 ml x 5), diclorometano (15 ml x 5), isopropanol (15 ml x 5) y éter dietílico (15 ml x 5).

20 El conjugado de péptido-enlazador unido a resina anteriormente mencionado se trató con 40 ml de una disolución que contenía ácido trifluoroacético (TFA) / trietilsilano (TES) / ditioneitol (DTT) / Tioanisol / agua (100/2/3/1/2). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1 h. Al final de la reacción, el disolvente se filtró. El filtrado se vertió en 400 ml de éter enfriado con hielo. Precipitó un sólido blanco. La mezcla se centrifugó y decantó. El sólido se lavó con éter dietílico (2 X 200 ml). El péptido-enlazador se purificó por HPLC de fase inversa (columna 30 x 100 mm C18, 25-40% AcCN / H₂O c/ 0,1% TFA en 20 min.). Las fracciones apropiadas se recogieron y evaporaron a sequedad produciendo 104 mg del producto deseado en la forma de un sólido blanco. El producto se identificó por espectrometría de masas (pico de iones moleculares, m/z 1465.3, z=3 y m/z 1099.2, z=4).

Síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico

25 Ejemplo 11

Se sintetizó ácido hialurónico reticulado con divinil sulfona de acuerdo con el siguiente esquema:



Ejemplo 11a

30 A hidróxido sódico 0,2M (168,9 g) se le añadió cloruro de sodio (23,4g) agitando hasta disolver. A la disolución bajo agitación mecánica rápida se le añadió hialuronato de sodio (25,4 g, 400 - 500KDa) que continuó durante 2 h. La disolución de polímero resultante tiene una concentración de ~ 12% p/p. Se preparó una disolución de divinilsulfona (0,41 ml, 0,48 g) en isopropanol (1,6 ml) y se añadió (5 x 0,4 ml) en ~ 30 seg. La mezcla se agitó durante otros 2 min y se vertió en una bandeja de vidrio de 23x28x6,5cm y se selló con una tapa de plástico. Después de reposar a TA durante 4h, el gel se transfirió como una sola pieza a una disolución de ácido clorhídrico 1M (100,1g) en 0,9% disolución salina (3 kg). Se agitó moderadamente a TA. Después de 24h, el pH de la disolución fue 2,28. La disolución se desechó dejando un gel (416,2 g). Al gel se le añadió luego 0,9% disolución salina (3 kg) y se agitó moderadamente a TA durante 18 h. A la mezcla se le añadió hidróxido sódico 1M (9,7 ml) a las 0, 2, 4, 6 y 8 h. El gel se agitó moderadamente otras 24 h a TA, momento en el cual el pH del gel fue 6,65. El gel se conservó a 2 - 8°C durante 120h y luego se añadió disolución de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4 (2 l). El gel se agitó durante otras 21 h y el lavado se desechó dejando un gel (1036,2 g) con una concentración de polímero final de 2,4%.

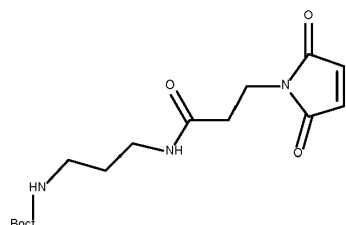
Ejemplo 11b. Síntesis alternativa de ácido hialurónico reticulado con divinilsulfona

45 A 35 g de hialuronato sódico se le añadieron 946 ml de agua estéril. La mezcla de reacción se mantuvo a 2-8°C durante 7 días, tiempo durante el cual se formó una disolución clara. A esta disolución se le añadieron 111 ml de disolución de hidróxido sódico 1,0 M, y la mezcla de reacción resultante se agitó vigorosamente durante 5 min. La mezcla de reacción se mantuvo a 2-8°C durante 90 min. Posteriormente se añadió una suspensión de 6,7 ml de

divinilsulfona en 10 ml de agua estéril a la disolución de polímero, y la mezcla de reacción resultante se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se conservó a 2-8°C durante 150 minutos seguidos de 90 minutos 25°C. El gel de polímero así formado se lavó con disolución salina estéril al 0,9% durante cuatro días. El pH de la suspensión se ajustó hasta 7,0 o bien con NaOH 1M NaOH o HCl 1,0 M. La concentración final de la suspensión de gel fue 0,58%.

Ejemplo 12

Síntesis de 1-(terc-butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil) aminopropano



En un matraz con fondo redondo de 250 ml se tomaron 3,0 g de 1-(terc-Butoxicarbonil) amino 3-aminopropano) y 100 ml de cloroformo anhidro. La mezcla de reacción se agitó a 25°C hasta formar una disolución clara. A esta disolución se le añadió *N*-succinimidil 3-maleimidopropionato (5,05 g) agitando hasta disolver seguido de 3,42 ml de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25°C durante 18 h. La disolución se lavó con ácido clorhídrico 1M (50 ml), 10% salmuera (50 ml), bicarbonato de sodio saturado (50 ml), salmuera semisaturada (50 ml). La fase orgánica se aisló y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de eliminar el sulfato de sodio por filtración, la disolución se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando acetato de etilo: hexanos como la fase móvil. La eliminación del disolvente a presión reducida seguida de secado al vacío ofreció el producto deseado en la forma de un sólido blanquecino (4,03 g).

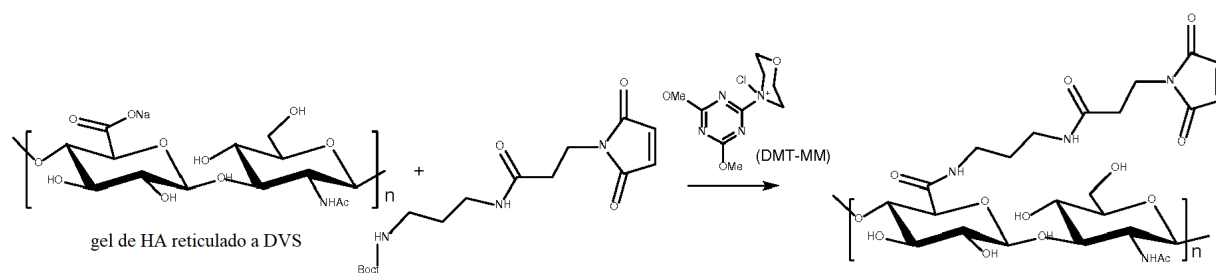
Ejemplo 13

Síntesis de 1-(terc-Butiloxicarbonil)amino 8-(3-maleimidopropil) amino-3,6-dioxaoctano

En un matraz con fondo redondo de 100 ml se tomaron 1-(terc-butiloxicarbonil) amino 8-amino-3,6-dioxaoctano (1,007 g) y 25 ml de acetonitrilo anhidro (25 ml). La mezcla de reacción se agitó en nitrógeno hasta que se disolvió. A esta disolución se le añadió 3-maleimidopropionato de *N*-succinimidilo (1,302 g) y la mezcla de reacción se agitó en nitrógeno a 25 °C durante 6 h. Al final de este periodo, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando diclorometano que contenía 2 - 6% de metanol. Después de eliminar el disolvente a presión reducida y de secar el residuo al vacío, se proporcionó 1,08 g del producto deseado en la forma de un sólido blanquecino.

Ejemplo 14

Síntesis de ácido hialurónico funcionalizado con 3-(3-maleimido-propil) aminopropano



A 15 g de suspensión reticulada a divinil sulfona (Ejemplo 1) se le añadieron 45 ml de agua desionizada (DI), y la suspensión resultante se agitó a 25 °C durante 10 minutos. Después de añadir 45 ml de etanol a la suspensión, se agitó durante otros 60 min. Le siguió la adición de 60 ml de etanol y se agitó durante 10 minutos. A esta suspensión se le añadieron 0,24 g de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMT-MM) disuelto en 5 ml de etanol. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25 ° durante 60 min. A 70 mg de 1-(terc-Butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil) aminopropano (ejemplo 2) disuelto en 2 ml de diclorometano anhidro se le añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético. La reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La disolución se concentró a presión reducida. El residuo resultante se trató con 3 ml de metanol y se evaporó hasta sequedad. Después de repetir este procedimiento una vez más, el residuo se disolvió en etanol (5 ml) y el pH se ajustó hasta 6 - 6,5 con 10% *N*-metilmorfolina en etanol. La disolución resultante se añadió a la suspensión de ácido hialurónico anterior. El vial se enjuagó con etanol (5 ml) y se añadió a la suspensión. Después de agitar durante 18 h a 25 °C, se

añadió salmuera saturada (2 ml) a la mezcla de reacción. La suspensión se trató con etanol (3 x 30 ml, 2 x 15 ml) para precipitar el gel de polímero. La mezcla de reacción se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante decantó. El residuo se hidrató en agua DI (20 ml) durante ~ 20 min y precipitó del etanol (4 x 10 ml). El método de ensayo de glucosamina sugiere que el grado de sustitución es 19 % en moles.

5 Ejemplo 15

Síntesis de ácido hialurónico funcionalizado con 3-(3-maleimido-propil) aminopropano

A 20 g de suspensión reticulada a divinil sulfona (Ejemplo 1) se le añadieron 60 ml de agua desionizada (DI) y la suspensión resultante se agitó a 25 °C durante 10 minutos. Después de añadir 60 ml de etanol a la suspensión, se agitó durante otros 60 min. Le siguió la adición de 60 ml de etanol y se agitó durante 10 minutos. A esta suspensión se le añadieron 0,325 g de DMT-MM disueltos en 10 ml de etanol. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25°
 10 durante 60 min. A 0,38 g de 1-(terc-Butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil) aminopropano (ejemplo 2) disueltos en 2,5 ml de diclorometano anhidro se le añadieron 2,5 ml de ácido trifluoroacético. La reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La disolución se concentró a presión reducida. El residuo resultante se trató con 3 ml de metanol y se evaporó a sequedad. Después de repetir este procedimiento una vez más, el residuo se disolvió en etanol (5 ml) y el pH se ajustó hasta 6 – 6,5 con 10% N-metilmorfolina en etanol. La disolución resultante se añadió a la suspensión de ácido hialurónico anterior. El vial se enjuagó con etanol (5 ml) y se añadió a la suspensión. Después de agitar durante 18 h a 25 °C, se añadió salmuera saturada (2 ml) a la mezcla de reacción. La suspensión se trató con etanol (3 x 30 ml, 2 x 15 ml) para precipitar el gel de polímero. La mezcla de reacción se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante decantó. El residuo se hidrató en agua DI (20 ml) durante ~ 20 min y precipitó a partir de etanol (4 x 10 ml). El método de ensayo de glucosamina sugiere que el grado de sustitución es 24% en moles.
 15
 20

Ejemplo 16a

Método general para la síntesis de hidrogel de HA funcionalizado con 3-(3-maleimido-propil) aminopropano

A una cantidad apropiada de suspensión de HA reticulado con divinilsulfona (Ejemplo 11b) se le añadió disolución salina estéril para obtener una concentración de gel de ~1% p/v. La suspensión resultante se agitó a 25°C durante 15 - 30 minutos. Un disolvente orgánico miscible en agua (preferiblemente etanol) se añadió a la suspensión y la suspensión resultante se agitó durante otros 30 - 60 min. A esta suspensión se le añadió una cantidad apropiada de una disolución etanólica de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMT-MM). El recipiente que contenía la disolución de DMT-MM se enjuagó dos veces con etanol y los lavados se añadieron a la suspensión anterior. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25°C durante 90 minutos. Se disolvió una cantidad apropiada de 1-(terc-butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil) aminopropano en diclorometano. A esta disolución se le añadió ácido trifluoroacético para dar una disolución 1:1(v/v). Después de agitar a temperatura ambiente durante 60 - 90 minutos, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en etanol y se añadió a la suspensión anterior. El recipiente que contenía el derivado de maleimida se enjuagó dos veces con etanol y los lavados se añadieron a la suspensión. El pH de la suspensión se ajustó hasta pH 6,4 – 6,6 usando una base orgánica o inorgánica (por ejemplo 10% N-metilmorfolina en etanol). Después de agitar durante 16 – 20 h a 25°C, la suspensión se trató con etanol hasta un volumen de 60 - 65% v/v. El disolvente se eliminó de la mezcla de reacción o bien por centrifugación a 120G seguido de decantación del sobrenadante o aplicando una ligera sobrepresión de gas N₂ al sistema y de filtrar a través de una frita de vidrio o una membrana de filtro. El residuo se trató posteriormente con disolución salina estéril de succinato 20 mM (0,9%) a pH 3,8 durante ~ 15 - 20 min y se precipitó añadiendo etanol a un volumen de 60 - 65% v/v. El disolvente se eliminó de la mezcla de reacción siguiendo el procedimiento anterior. Este procedimiento se repitió una vez más.
 25
 30
 35
 40

Ejemplo 16b

45 Síntesis de hidrogeles de HA funcionalizados con 3-(3-maleimido-propil) aminopropano en un grado de sustitución de 20 % en moles

A 5,65 g de la suspensión de hidrogel de HA (Ejemplo 11b) se le añadieron 7,5 ml de disolución salina estéril y la suspensión resultante se agitó moderadamente durante 15 minutos. A esta suspensión se le añadieron 3 ml de etanol y la mezcla de reacción resultante se agitó suavemente durante 60 min. A esta suspensión se le añadieron 94 mg de DMT-MM disuelto en 3 ml de etanol. El vial que contenía DMT-MM se lavó con etanol (2 x 1 ml) y los lavados se añadieron a la suspensión. La mezcla de reacción se dejó agitar suavemente a temperatura ambiente durante 90 minutos. A 21,7 mg de 1-(terc-Butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil)aminopropano se le añadieron 0,25 ml de diclorometano, y la reacción se mezcló suavemente hasta que se formó una disolución clara. A esta disolución se le añadió 0,25 ml de ácido trifluoroacético y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante 75 min. Luego la disolución se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 3 ml de etanol y la disolución resultante se añadió a la suspensión de hidrogel anterior. El vial que contenía el reactivo de maleimida se enjuagó con etanol (2 x 1 ml) y los lavados se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la mezcla de reacción se ajustó luego hasta 6,41 usando 10% v/v N-metilmorfolina en etanol y la mezcla de reacción resultante se agitó suavemente durante 18 horas a temperatura ambiente. Al final de este periodo, el pH de la mezcla de reacción se ajustó hasta pH 3,89 tratando con
 50
 55

HCl 1,0 M. El gel precipitó añadiendo etanol (4 x 3,5 ml). La suspensión se centrifugó a 120G durante 2 min a 20°C y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente usando una pipeta. El residuo se rehidrató en 12 ml de tampón 20,0 mM SBS (pH 3,8) agitando/mezclando suavemente durante 15 minutos. La suspensión se sometió al tratamiento de etanol adicional (4 x 5 ml, 1 x 4 ml). Después de cada tratamiento de etanol, la suspensión se centrifugó a 120G durante 2 min a 20°C seguido de eliminación cuidadosa del sobrenadante. Finalmente, el vial se invirtió, se dejó drenar durante 15 minutos, y el sobrenadante decantó produciendo 0,8876 g del gel húmedo.

Ejemplo 16c

Síntesis de ácido hialurónico funcionalizado con 3-(3-maleimido-propil) aminopropano

A 10 g de una suspensión reticulada con divinil sulfona (Ejemplo 11a) se le añadieron 40 ml de agua desionizada (DI) y la suspensión resultante se agitó a 25°C durante 10 minutos. Después de añadir 30 ml de etanol a la suspensión, se agitó durante otros 60 minutos. Le siguió la adición de 60 ml de etanol y se agitó durante 10 minutos. A esta suspensión se le añadieron 0,162 g de DMT-MM disuelto en 7,5 ml de etanol. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25°C durante 60 min. A 29 mg de 1-(terc-Butoxicarbonil) amino 3-(3-maleimidopropil) aminopropano (ejemplo 2) disueltos en 0,5 ml de diclorometano anhidro se le añadieron 0,5 ml de ácido trifluoroacético. La reacción resultante se trató con 2 ml de metanol y se evaporó hasta sequedad. Después de repetir este procedimiento una vez más, el residuo se disolvió en etanol (7,5 ml) y 9,5 µl de N-metilmorfolina. La disolución se añadió a la suspensión de ácido hialurónico anterior y el pH se ajustó hasta 7,1 usando N-metilmorfolina. El vial se enjuagó con etanol (5 ml) y se añadió a la suspensión. Después de agitar durante 21 h a 25 °C, se añadió salmuera saturada (2 ml) y el gel precipitó añadiendo etanol (4 x 15 ml). La suspensión se dejó reposar durante 15 min y el sobrenadante decantó. El hidrogel se hidrató en PBS 20mM, pH5 (35 ml) y precipitó por adición de etanol (5 x 15 ml). El procedimiento se repitió, la muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 1,5 min, y el sobrenadante decantó. El método de ensayo de glucosamina sugiere que el grado de sustitución es 24 % en moles.

Ejemplo 17

25 Síntesis de ácido hialurónico funcionalizado con 8-(3-maleimidopropil) amino-3,6-dioxaoctano

En un matraz con fondo redondo de 250 ml se tomaron 0,5 g de HA liofilizado (ejemplo 11a) y 50 ml de disolución salina al 0,9%. La mezcla de reacción se dejó agitar suavemente a 25 °C durante una hora. A esta suspensión se le añadieron 40 ml de etanol y la suspensión se agitó durante 5 min. En un vial de 10 ml se tomaron 0,35 g de DMT-MM y 5 ml de etanol. La disolución se añadió a la suspensión de HA. El vial se enjuagó con 5 ml de etanol y se añadió a la suspensión. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25 °C durante 1 h. Posteriormente, 86 mg de 1-(terc-Butiloxicarbonil) amino 8-(3-maleimidopropil) amino-3,6-dioxaoctano disueltos en 0,5 ml de diclorometano anhidro se trataron con 0,5 ml de ácido trifluoroacético y se añadieron a. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La disolución se concentró a presión reducida, se disolvió en 2 ml de etanol y se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El tratamiento con etanol se repitió dos veces. El residuo se disolvió en 5 ml de etanol/agua (1:1) y el pH de la disolución se ajustó hasta 6,5 usando N-metilmorfolina (60 µl). La disolución resultante se añadió a la suspensión anterior. Después de agitar durante 4 h a 25°C, el pH de la suspensión se ajustó hasta 3,75 con HCl 0,1M y el gel precipitó añadiendo etanol (7 x 25 ml). La suspensión se dejó reposar durante 30 min y 80% del sobrenadante se eliminó por decantación. La suspensión restante se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Después de eliminar el disolvente, el residuo se trató con disolución salina al 0,9% y precipitó de etanol (7 x 15 ml). El residuo se secó por liofilización. El grado de sustitución, según lo determinado por el ensayo de glucosamina, era 7,3 % mol.

Ejemplo 18

Síntesis de ácido hialurónico que contenía el grupo 2-piridiltiol

A una disolución agitada rápidamente de 200 mg de hialuronato sódico (peso molecular = 500 kDa) disueltos en 24 ml de agua desionizada se le añadieron 16 ml de acetonitrilo gota a gota. Después de completar la adición de acetonitrilo, se añadieron 17,6 mg de clorodimetoxitriazina en 2 ml de agua/acetonitrilo (1:1) a la mezcla de reacción seguidos de 20 µl de N-metilmorfolina. La reacción se agitó a 25°C durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 26,8 mg de hidrocloreuro de 2-((3-nitropiridin-2-il)tio)etanamina disueltos en 1 ml de agua desionizada. La reacción se dejó agitar durante 18 horas. El pH de la reacción se ajustó hasta 6,0 añadiendo HCl 1M. A la mezcla de reacción resultante se le añadieron 15 ml de Amberlite® CG-120 pre-lavado (forma Na⁺) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos. La resina se separó por filtración y se lavó con agua desionizada (2 x 5 ml). El procedimiento de tratamiento con Amberlite® CG-120 (forma Na⁺) se repitió dos veces. La disolución se diluyó con agua para formar una disolución que contenía 20 % en vol de acetonitrilo. La disolución se filtró por centrifugación usando dispositivos centrífugos Macrosep® (umbral de peso molecular 30K). La fracción retenida se lavó con agua desionizada (5 x 200 ml). Las fracciones retenidas se combinaron y liofilizaron proporcionando 120 mg del producto en la forma de un sólido blanquecino. El grado de modificación fue 10%. Otro grupo de 2-piridiltiol que contenía ácido hialurónico se sintetizó usando hialuronato de sodio de 70 kDa de peso molecular siguiendo el procedimiento similar.

Ejemplo 19

Síntesis de HA funcionalizado con maleimida soluble

En un matraz de 100 ml se tomaron 200 mg de ácido hialurónico, sal de sodio (peso mol. = 500 kDa) y 24 ml de agua DI. Se agitó hasta que se obtuvo una disolución clara. A la disolución de HA rápidamente agitada se le añadieron 16 ml de etanol en cloruro de 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (55 mg, 0,2 mmol) en agua/etanol se le añadieron junto con *N*-metilmorfolina (20 μ l, 0,2 mmol) y la reacción se añejó durante una hora. Se añadió una disolución acuosa de sal de 1-(2-(2-aminoetoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-dioneo•trifluoroacetato (60 mg, 0,2 mmol). La reacción se dejó durante la noche. El pH se ajustó hasta ligeramente ácido y se añadió Amberlite® CG-120 pre-lavado, forma Na⁺ (\geq 15ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 20 minutos. La resina se separó por filtración y se lavó con agua. Al filtrado se le añadió nuevamente Amberlite® CG-120 pre-lavado, forma Na⁺ (\geq 15 ml) y se siguió el mismo procedimiento que anteriormente. Se repitió todo el ciclo una vez más. La disolución se diluyó con agua para formar una disolución acuosa que contenía <20% etanol. La disolución se filtró por centrifugación usando cuatro dispositivos centrífugos Macrosep® de PALL, umbral de peso molecular 30K (5000 rpm, tiempo de centrifugación 15 minutos. La membrana se aclaró cada vez golpeando suavemente una espátula sobre ella y agitando vigorosamente el dispositivo sellado). Las fracciones retenidas se lavaron varias veces con agua desionizada (>200ml). Los concentrados de HA modificados resultantes se combinaron y liofilizaron. La recuperación oscila entre 50-75%. Grado de modificación ~ 20% de acuerdo con la RMN.

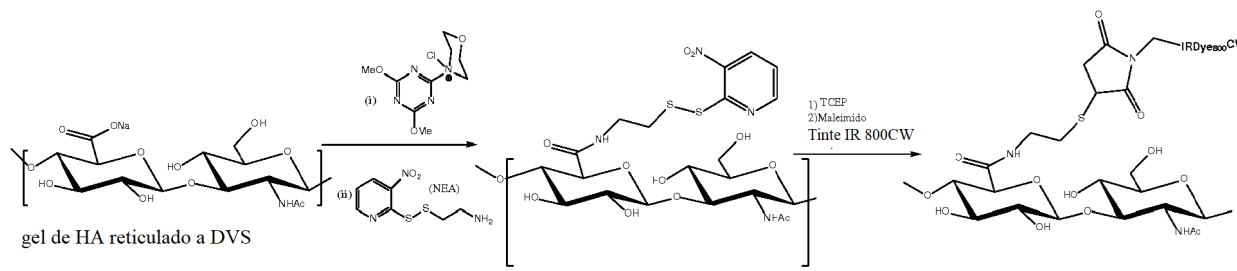
Ejemplo 20

Estimación del contenido de maleimida en hidrogeles de ácido hialurónico

La estimación de grupos maleimida incorporados a los hidrogeles de HA se realizó con el método de análisis colorimétrico. Se preparó ácido 5-tio 2-nitrobenzoico preparado por reducción de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) con hidrocloreto de *Tris*-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón PBS a pH 7,5. Se usó 20 % mol exceso de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) para prevenir reacciones colaterales con TCEP. Se suspendió una cantidad predeterminada del hidrogel funcionalizado con maleimida en disolución salina tamponada con succinato 20 mM (SBS) a pH 3,5. Se añadió la disolución de ácido 5-Tio 2-nitrobenzoico anterior a la suspensión de hidrogel y la mezcla de reacción se mezcló en vórtex (2 x 10 segundos) y se agitó luego suavemente a 25°C durante 45 min. La suspensión se centrifugó luego a 25°C durante 10 min y se tomó una alícuota del sobrenadante. La absorbancia del sobrenadante se midió a 412 nm. La concentración de ácido 5-tio 2-nitrobenzoico en la disolución se estimó usando una curva de calibración. La concentración de maleimida en los hidrogeles es equivalente a los moles del tiol sometido a reacción, que se calcula a partir de la diferencia entre la cantidad de ácido 5-tio 2-nitrobenzoico añadida y aquella presente en el sobrenadante.

Ejemplo 21

Síntesis de hidrogel de HA conjugado a tinte prácticamente infrarrojo (Tinte IR 800CW)



Ejemplo 21 a. Síntesis de ácido hialurónico reticulado a divinilsulfona conjugado con hidrocloreto de 3-nitro-2-(2'-amino-etildisulfanil)piridina (NEA)

Una suspensión que contenía 5,1 g (23 mg/g de agua) de hidrogel de ácido hialurónico reticulado a divinilsulfona (ejemplo 5) y 20 ml de agua estéril se agitó suavemente a 25°C durante 15 min. A esta suspensión se le añadió etanol (20 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a 25°C por una hora. A esta suspensión se le añadieron 0,081g de DMT-MM disueltos en 5 ml de etanol. El vial que contenía la disolución de DMT-MM se enjuagó con 2,5 ml de etanol, y el lavado se añadió a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó a 25°C por 1 hora, seguido de adición de 0,017 g de NEA. Después de agitar la mezcla de reacción durante 22 h a 25°C, se añadieron 2 ml de salmuera al gel. El disolvente se eliminó por centrifugación y el residuo se lavó con múltiples tratamientos de etanol (4 x 10 ml, 1 x 5 ml). La suspensión se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y luego a 5000 rpm por 5 min (la temperatura del centrifugo se mantuvo a 5°C). El sobrenadante decantó y el residuo se dejó equilibrar durante 20 min en agua estéril (20 ml). Posteriormente, se sometió a dos tratamientos con etanol (4 x 10 ml). La suspensión se dejó reposar durante 30 min y el sobrenadante decantó. El procedimiento de tratamiento con etanol se repitió una vez más y el gel húmedo se conservó a 2°C hasta la etapa siguiente.

Ejemplo 21b. Síntesis de tinte NIR conjugado a hidrogel de HA

Bajo condiciones asépticas, se recogieron 0,224 g de ácido hialurónico modificado con NEA (ejemplo 15a) y 13 ml de agua estéril en un vial de reacción estéril de 50 ml y la mezcla se dejó agitar suavemente durante 15 min a 25°C. A esta suspensión se le añadieron 20 ml de etanol, y la suspensión se agitó durante 1 h a 25°C. Posteriormente, se añadieron 14 mg de TCEP a la suspensión, y la mezcla de reacción se agitó durante 16 h a 25°C. Al final de la reacción, se añadieron 2 ml de salmuera a la mezcla de reacción. Luego el gel se sometió a 5 ciclos de tratamiento con etanol (5 ml) y centrifugación (5000 rpm, 5 min., 5°C). Después de eliminar el sobrenadante, el residuo se trató con 10 ml de disolución salina estéril al 0,9% seguido de 5 tandas de tratamiento con etanol (5 ml) y centrifugación, como se mencionó anteriormente. El residuo se suspendió en 10 ml de disolución salina estéril al 0,9%. A esta suspensión se le añadieron 1,8 mg de tinte IR800CW funcionalizado con maleimida disueltos en disolución salina estéril al 0,9% (3 ml) usando un filtro de deshidrogenación estéril. El filtro se enjuagó con 5 ml de etanol y etanol/disolución salina 1:1 (2 x 5 ml) y se añadieron los lavados a la mezcla de reacción. El recipiente de reacción se agitó suavemente en la oscuridad durante 2 h a 25°C y se mantuvo a 2°C durante 66 h. Luego se añadieron 11,5 mg de N-metilmaleimida disueltos en 3 ml de etanol a la mezcla de reacción, y la suspensión se agitó suavemente por otras 3 horas a 25°C. Al final de la reacción, la suspensión se centrifugó (5000 rpm, 5°C, 2 x 15 min) y se eliminaron 20 l del sobrenadante. La suspensión remanente precipitó del etanol (5 x 5 ml) y se centrifugó adicionalmente (5000 rpm, 5°C, 5 min) y el sobrenadante decantó. Se añadieron 10 ml de disolución salina estéril al 0,9% al residuo, seguidos de 5 ml de etanol. La suspensión se centrifugó (5000 rpm, 5min, 5°C) y el sobrenadante decantó. El tratamiento con etanol y el procedimiento de centrifugación se repitieron cuatro veces más. El residuo se trató con 10 ml de disolución salina estéril al 0,9% y se conservó a 2°C en la oscuridad, cubriendo el vial con papel de aluminio.

Conjugación de enlazador de tio péptidos a hidrogel de HA funcionalizado con maleimida

Ejemplo 22

Procedimiento general para péptidos que portan enlazador con indicador terminado en tiol a hidrogeles de HA funcionalizados con maleimida

En un reactor estéril y despirogenado con una frita o un filtro de porosidad media se recogió una cantidad adecuada del hidrogel de HA modificado con maleimida (ejemplo 3). Posteriormente, se añadió una cantidad apropiada del tampón SB 20m Mol filtrado estéril (que contenía 15 % v/v propilenglicol y 0,01% p/v Tween 20, pH 3,8) a la reacción, de modo tal que la concentración de la suspensión resultante fuese ~ 1% p/p. La suspensión se dejó mezclar durante 30 – 90 minutos con agitación suave. Al final de este periodo, se añadió una cantidad apropiada del péptido que porta el enlazador con indicador terminado en tiol disuelto en tampón SB 20 mMol filtrado estéril (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01 % p/v Tween 20, pH 3,8) al reactor, y la mezcla de reacción resultante se dejó agitar suavemente a temperatura ambiente durante 1,5 - 24 horas. Al final de la reacción, el sobrenadante se eliminó por filtración usando un ligero exceso de presión de nitrógeno o por centrifugación de la suspensión. El residuo se trató con tampón SBS 20 mM filtrado (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01% p/v Tween 20, pH 3,0) para preparar una suspensión 0,7 % p/v, se agitó durante 3 minutos, se centrifugó y el sobrenadante se eliminó por decantación. Este procedimiento se repitió cinco veces. El residuo se trató con disolución 10 mM de 1-Hidroxi-2-mercaptoetano disuelto en tampón SBS 20 mM filtrado estéril (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01 % p/v Tween 20, pH 3,0) para preparar una suspensión de ~1 % en peso, y se dejó agitar suavemente durante 30 minutos con agitación/mezclado suave. El disolvente se eliminó por centrifugación seguido de decantación como se mencionó anteriormente. Este procedimiento de tratamiento con 1-Hidroxi-2-mercaptoetano se repitió cuatro veces. El residuo se suspendió en tampón SBS 20 mM filtrado estéril (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01% p/v Tween 20, pH 3,0) para preparar una suspensión de ~0,5 % en peso concentración y se mezcló durante 3 minutos seguido de eliminación del por centrifugación y decantación. El residuo resultante se suspendió en tampón SBS 20 mM (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01 % p/v Tween 20, pH 6,5) para preparar una suspensión 0,7 % en peso y se agitó durante 20 minutos y se filtró. Después de repetir este procedimiento una vez más, el residuo se dispuso en tampón SBS 20 mM (que contenía 15% v/v propilenglicol y 0,01% p/v Tween 20, pH 4,5) para preparar una suspensión al 0,5 % en peso, se agitó durante 15 minutos y se filtró. Este procedimiento se repitió una vez más. El residuo se suspendió en agua estéril (pH 4,5), se agitó durante 5 minutos y se filtró. El procedimiento se repitió cinco veces y. El residuo se filtró asépticamente usando un filtro de membrana estéril y se liofilizó hasta sequedad.

La Tabla 3 resume los resultados de las síntesis de distintos conjugados de hidrogel de HA de los péptidos de agonistas duales obtenidos variando las condiciones de reacción y la naturaleza del enlazador sin indicador.

Cantidad de hidrogel de HA modificado con maleimida (mg)	Contenido de maleimida en hidrogel (% mol)	Tipo de enlazador	Cantidad de péptido utilizado (mg)	Rendimiento del conjugado hidrogel-péptido (mg)	Carga de péptido (% carga)	Carga de péptido (% mol)
36	3,4	Asn	2,1	20	4	0,41

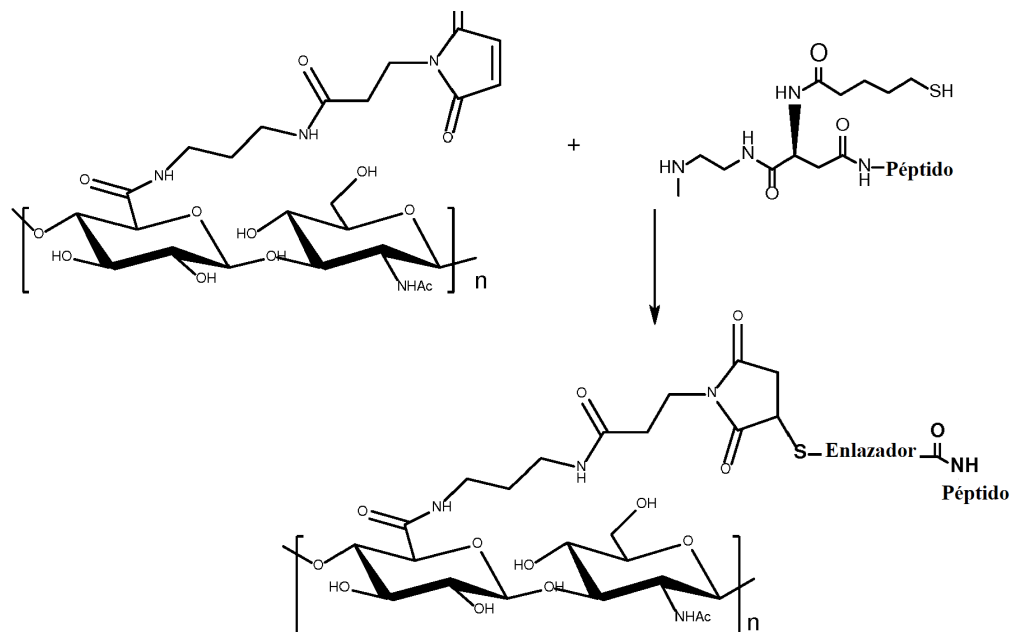
ES 2 759 752 T3

Cantidad de hidrogel de HA modificado con maleimida (mg)	Contenido de maleimida en hidrogel (% mol)	Tipo de enlazador	Cantidad de enlazador de péptido utilizado (mg)	Rendimiento del conjugado hidrogel-péptido (mg)	Carga de péptido (% carga)	Carga de péptido (% mol)
35	4,9	Asn	2,4	31	2,4	0,24
297	10,8	Asn	30,6	228	4	0,41
57,5	3,8	Asn	15	66,3	11,1	1,2
54	3,8	Asn	23	77,8	15,9	2,18
48	5,7	Asn	30	60,8	21,0	2,6
73,2	5,2	Asn	15,8	51,6	11	1,2
137	N.D.	Asn	62,5	150	21,7	2,69
90	9,8	Aib	13,3	78	6,5	0,69
50	8,8	D-Ala	3,7	49,3	N.D.	N.D.
41	6,2	D-Ala	9,2	52	N.D.	N.D.

Tabla 3b: Los siguientes conjugados se prepararon como se describe en los ejemplos 14 a 22

Cantidad de hidrogel de HA reticulado (g)	Contenido de HA en gel (%)	Carga de maleimida en hidrogel después de la activación (mol%)	Tipo de enlazador	Cantidad de enlazador de péptido utilizado (mg)	Rendimiento de conjugado de péptido-hidrogel liofilizado (g)	Contenido de péptido por RMN (% mol)
200	2,3	12,1	Aib	508	6,4	N.D.
40	2,3	14,8	Aib	102	1,2	N.D.
40	2,3	9,6	Aib	108	0,84	N.D.
40	2,3	13,6	Aib	203	0,89	6,5
40	2,3	11,0	Aib	102	0,82	3,6
40	2,3	12,5	Aib	104	0,71	5,9
40	2,3	16,8	Aib	108	0,49	9,0
40	2,3	8,0	Aib	102	1,2	N.D.
40	2,3	13,5	Aib	102	1,1	4,4
30	2,6	22	Aib	127	0,67	5,3
30	2,6	18,2	Aib	201	0,45	6,5

Conjugación del enlazador 7 que contiene Exendina-4 Seq ID No. 26 funcionalizada con tiol con ácido hialurónico funcionalizado con maleimida



5

A 53 mg de hidrogel de DVS-HA modificado con 3-(3-maleimidopropil) aminopropano (ejemplo 15) se le añadieron 7 ml del SBS 20 mM que contenía 0,01 % en peso Tween® 20, propilenglicol (15% v/v). El pH del tampón es 3,8. La suspensión se agitó suavemente a 25°C durante 90 min. A esta suspensión se le añadieron 2,1 mg de Exendina-4 Seq ID 26 funcionalizada con diol con el enlazador del ejemplo 7 disuelto en 1 ml del tampón anterior. El vial del péptido se enjuagó con tampón (2 x 0,5 ml) y se añadió el lavado a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 25°C durante 18 h. La suspensión se centrifugó posteriormente a 1750 rpm durante 2 min, y el sobrenadante decantó cuidadosamente. El hidrogel se suspendió en 10 ml de tampón SBS 20 mM que contenía 0,01 % en peso de Tween® 20, propilenglicol 15% v/v, pH 3, se agitó durante 2 min, se centrifugó a 1750 rpm por 2 min, y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió cuatro veces más. El residuo se trató con 2 ml de 1-Hidroxí-2-mercaptoetano 10 mM disuelto en SBS 20 mM, pH 3, y la reacción se dejó proceder durante 30 min. La mezcla de reacción se centrifugó a 2000 rpm por 2 min y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió tres veces más. El residuo se suspendió en 10 ml de SBS 20 mM que contenía 0,01% en peso Tween® 20, pH 3, se agitó por 2 min, se centrifugó a 2000rpm durante 2 min y el disolvente decantó. El residuo se suspendió posteriormente en 10 ml de agua estéril acidificada (pH 3,5) que contenía 0,01 % en peso Tween® 20, se agitó durante 10 min, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió con 8, 7 y 6 ml del agua estéril acidificada anterior. La muestra se liofilizó proporcionando 78 mg del péptido conjugado a hidrogel de HA en la forma de un sólido blanquecino con 4 % en peso de carga de péptido en el hidrogel.

Ejemplo 23

Conjugación del enlazador que contiene Exendina-4 Seq ID 26 funcionalizada con tiol con ácido hialurónico funcionalizado con maleimida

La reacción y el tratamiento se efectuaron usando los tampones desoxigenados y en atmósfera de nitrógeno. A 36 mg del hidrogel de DVS-HA modificado con 3-(3-maleimidopropil) aminopropano (ejemplo 15) se le añadieron 6 ml de SBS 20 mM (que contenía 0,01 % en peso Tween® 20, 10% v/v propilenglicol). El pH del medio se ajustó a 6. La suspensión se agitó suavemente a 25°C durante 30 min. A esta suspensión se le añadieron 2,4 mg de Exendina-4 Seq ID 26 funcionalizada con tiol con el enlazador (ejemplo 7) disuelto en 1 ml del tampón antes mencionado (pH 6). El vial del péptido se enjuagó con tampón (2 x 0,5 ml) y se añadió el lavado a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 25°C durante 90 min. La suspensión se centrifugó posteriormente a 4000 rpm durante 2 min y el sobrenadante decantó cuidadosamente. El hidrogel se suspendió en 10 ml de SBS 20 mM a pH 3 (que contenía 0,01 % en peso Tween® 20, y 10 % v/v propilenglicol), se mezcló durante 2 min, se centrifugó a 3005G durante 2 min, y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió cuatro veces más. El residuo se trató con 2 ml de 1-hidroxí-2-mercaptoetano 10mM en SBS 20 mM, pH3 durante 30 min, se centrifugó a 4000 rpm durante 2 min y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió tres veces más. El residuo se suspendió en 10 ml de SBS 20 mM que contenía 0,01 % en peso Tween® 20 (pH 3), se mezcló durante 2 min, se centrifugó a 4000 rpm durante 2 min,

y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió cuatro veces más. El residuo se suspendió en agua estéril acidificada (pH 3,5) que contenía 0,01 % en peso Tween® 20, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, y el disolvente decantó. Este procedimiento se repitió usando 8, 7 y 6 ml del agua estéril anterior. El residuo se liofilizó para dar 31 mg de péptido conjugado a HA en la forma de un sólido blanquecino con 2,4 % en peso de carga de péptido en el hidrogel.

Ejemplo 24

Procedimiento para estimación de la carga de péptido en los conjugados de hidrogel-péptido

Una cantidad predeterminada de conjugado de hidrogel de HA-péptido se suspendió en tampón CHES (pH 9,5) y la suspensión se dejó agitar suavemente a 70°C. La suspensión se centrifugó y la alícuota se analizó para contenido de péptido por el método de HPLC. El método de HPLC comprende el uso de una columna q C-18 Kinetics (diámetro interno = 4,6 mm y longitud = 100 mm, tamaño de partícula 2,6 µm, Phenomenex) usando Agilent 1100 LC. La composición de la fase móvil A es 90% agua / 10 % Acetonitrilo / 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) y la fase móvil B es 10% Acetonitrilo / 90% agua / 0,09 % TFA. El gradiente es de fase móvil 25% B a 55% B en 8 minutos. El caudal se mantuvo a 1 ml / min. Se usaron los péptidos puros como estándares para cuantificar el péptido liberado del hidrogel.

Ejemplo 25

Determinación del tiempo de residencia *in vivo* del hidrogel de HA

El tiempo de residencia de los hidrogeles *in vivo* en el espacio subcutáneo se investigó por imágenes de resonancia magnética (RMN). La intensidad del contraste de protones en agua dentro del hidrogel se usó para evaluar el tiempo de residencia de los hidrogeles *in vivo*. Para este propósito, se usaron ratones: CAnN.Cg-Foxn1 nu/Crl como los animales. El hidrogel se inyectó usando una aguja de G 31 siguiendo los protocolos aprobados de cuidado de animales. Se tomaron imágenes de RMN del sitio de inyección periódicamente durante un periodo de tiempo. En un grupo, se inyectó el hidrogel y en el otro grupo, se usó una suspensión que contenía una mezcla 1:1 (p/p) de hidrogel y 800.000 Da HA soluble. En el caso del hidrogel puro, el gel fue evidente durante 3 semanas con lenta pérdida de intensidad (Figura 2). Por otra parte, para la mezcla que contenía HA soluble, la señal de RMN, que fue intensa el día 1, se redujo significativamente el día 4 (2). Esto sugiere que para mejorar el tiempo de residencia del vehículo de polímero es necesario que se reticule para lograr un muy alto peso molecular.

Figura 2a. Imágenes de RMN del hidrogel de HA en el sitio de inyección en función del tiempo.

Figura 2b. Imágenes de RMN de la suspensión de polímero que contiene 1:1 (p/p) hidrogel de HA-800 kDa HA soluble en el sitio de inyección en función del tiempo.

Ejemplo 26

Cinética de liberación *in vitro*

Se transfirió una alícuota del hidrogel enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón 8 (0,5 mg agonista de GLP-1/Glucagón) a una jeringa equipada con una frita de filtro y se lavó 5 veces con tampón de fosfato pH 7,4 (60 mM, EDTA 3 mM, 0,01% 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 cada uno), el sobrenadante se intercambiaba y el agonista de GLP-1/Glucagón liberado se cuantificó por RP-HPLC a 215 nm. Las señales de UV correlacionadas al agonista de GLP-1/Glucagón liberado se integraron y trazaron contra el tiempo de incubación. Se aplicó el software de ajuste de curvas para estimar la correspondiente semivida de liberación.

Figura 3. Cinética de liberación *in vitro* del agonista dual de Exendina-4 Seq ID 26 con el enlazador del hidrogel de HA (ejemplo 23). La semivida es ~ 5 días.

Ejemplo 27

Ensayos celulares *in vitro* para eficacia del receptor de GLP-1, el receptor de Glucagón y el receptor de GIP

El agonismo de los péptidos para los receptores se determinó mediante ensayos funcionales midiendo la respuesta de cAMP de las líneas celulares HEK-293 que expresan en forma estable el receptor de GIP, GLP-1 o Glucagón humano.

Se determinó el contenido de cAMP de las células usando un kit de Cisbio Corp. (cat. núm. 62AM4PEC) en base a HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo). Para preparación, las células se dividieron en matraces de cultivo T175 y se desarrollaron durante la noche hasta prácticamente confluencia en el medio (DMEM / 10% FBS). El medio luego se eliminó y las células se lavaron con PBS que carecía de calcio y magnesio, seguido de tratamiento de proteinasa con accutasa (Sigma-Aldrich cat. núm. A6964). Las células desprendidas se lavaron y resuspendieron en tampón de ensayo (1 x HBSS; HEPES 20 mM, 0,1% BSA, IBMX 2 mM) y se determinó la densidad celular. Luego se diluyeron hasta 400000 células/ml y 25 µl-alícuotas se dispensaron en los pocillos de placas de 96 pocillos. Para

medición, se añadieron a los pocillos 25 µl del compuesto de ensayo en tampón de ensayo, seguidos de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de añadir los reactivos de HTRF diluidos en tampón de lisis (componentes del kit), las placas se incubaron durante 1 hora, a lo cual le siguió la medición de la relación de fluorescencia a 665 / 620 nm. La potencia *in vitro* de los agonistas se cuantificó determinando las concentraciones que causaron 50% de activación de la respuesta máxima (CE50).

Ejemplo 28

Reducción de glucosa en ratones dbdb diabéticos hembra

Se usaron ratones dbdb diabéticos hembra (BKS.CG-m +/+ Lepr(db)/J) de 24-27 semanas de vida al comienzo del estudio. Los ratones llegaron a las 10-13 semanas de vida y fueron habituados a las condiciones de alimentación y alojamiento durante por lo menos 1 semana, luego se usaron en un primer estudio y después de un periodo de lavado de por lo menos 2 semanas finalmente se reutilizaron para el presente estudio. Diecinueve días antes del comienzo del estudio, se determinaron los valores individuales de HbA1c para estratificar y de allí en más asignar los animales a 4 grupos con N=8 por grupo para proporcionar grupos con valores HbA1c medios lo más equivalentes posibles. Los animales tuvieron acceso a alimento y agua a voluntad durante todo el estudio. El primer día del estudio, se determinó la glucosa en sangre del estudio por incisión en la punta del rabo justo antes y 4 horas después del tratamiento subcutáneo individual (08:00 - 09:00 am) o bien con vehículo (tampón de succinato estéril) o el conjugado de HA diluido del agonista de GLP-1/Glucagón Seq. ID 26 del ejemplo 23 en las dosis de 50, 100 y 200 nmol/kg diluido en vehículo. De allí en más, se efectuaron mediciones diarias de la glucosa en sangre durante los siguientes 16 días, todas en un horario del día similar (08:00 - 09:00 am) con la excepción de los días 11 y 12 (fin de semana). Además se monitoreó la ingesta de alimento y el consumo de agua a diario. Se analizaron los datos de la glucosa mediante ANOVA de dos vías en mediciones repetidas, seguidas por la prueba post-hoc de Dunnett con un nivel de significación de $p < 0,05$. El análisis AUC de glucosa se llevó a cabo usando un ANOVA de una vía seguido por la prueba post-hoc de Dunnett con un nivel de significación de $p < 0,05$.

La Figura 4 muestra la concentración de glucosa en sangre en relación con la situación inicial frente al tiempo después de una inyección en varias dosis de conjugado de HA-agonista de GLP-1/Glucagón con la Seq. ID 26.

Ejemplo 28b Efectos reductores de glucosa en ratones dbdb diabéticos hembra

Ratones db/db diabéticos, obesos (BKS.CG-m +/+ Lepr(db)/J) y controles magros, saludables (BKS.Cg-m +/+ Lepr(db)/J) llegaron con 10-11 semanas de vida y se habituaron a condiciones de alimentación y animalario. A las 12-13 semanas se determinaron los valores HbA1c individuales para estratificar y asignar los animales a diferentes grupos con N=8 por grupo. La meta fue proveer grupos con valores HbA1c medios lo más equivalentes posible. A las 13-14 semanas de vida, los 2 grupos de ratones db/db recibieron una dosis individual s.c. 100 nmol/kg masa corporal de un conjugado con la Seq. ID 26 o bien de HA soluble o reticulado. Al mismo tiempo y en un segundo momento en el día 7, un tercer grupo de ratones db/db y las referencias magras sanas recibieron una inyección s.c. de tampón de succinato y HA soluble en una relación 1:1. En todos los grupos, se inyectó un volumen total de 5 ml/kg masa corporal. Las concentraciones de glucosa en sangre en ayunas matutina se determinaron justo antes (entre 08:00 - 09:00 am) y cuatro horas después del tratamiento y de allí en más todos los días entre 08:00 - 09:00 am. Se recogió sangre de las incisiones de la punta del rabo y se determinaron las concentraciones mediante un glucómetro manual (Accu Check). Durante todo el periodo del estudio, los animales de todo el periodo del estudio tuvieron acceso a agua y alimento a voluntad.

La Figura 4b muestra la concentración de glucosa en sangre en relación a la situación inicial frente al tiempo después de una inyección de conjugado de HA reticulado y soluble-agonista de GLP-1/Glucagón con la Seq. ID 26.

Ejemplo 28c

Efecto reductor de glucosa en ratones db/db diabéticos hembra

Después de arribar, los ratones db/db diabéticos, obesos, hembra (BKS.CG-m +/+ Lepr(db)/J) se habituaron a condiciones de alimentación y animalario. Tenían 12 semanas de vida al comienzo del estudio. Se determinaron los valores HbA1c individuales el día 10 de la fase pre-dosis para estratificar y asignar a los animales a diferentes grupos con N=8 por grupo. La meta era proporcionar grupos con valores HbA1c medios lo más equivalentes posible. El día 1 de la fase de administración, los ratones db/db recibieron una única dosis s.c. de 12,75 mg/kg masa corporal o bien de conjugado con Seq ID 45, 46, 48 y 49. Los animales Db/db del grupo vehículo recibieron una inyección s.c. de PBS. En todos los grupos, se inyectó un volumen total de 10 ml/kg masa corporal. Las concentraciones de glucosa en sangre matutina no en ayunas se determinaron justo antes (entre 08:00 - 09:00 am) y cuatro horas después del tratamiento del día 1 de la fase de administración y de allí en más todos los días entre 08:00 - 09:00 am. Se extrajo sangre por incisión en la punta del rabo y se determinaron las concentraciones con un glucómetro manual (Accu Check). En todo el periodo de estudio, los animales tuvieron acceso a agua y alimento a voluntad.

La Figura 4c muestra la concentración de glucosa en sangre en relación a la situación inicial frente al tiempo después de una inyección en varias dosis de HA-agonista de GLP-1/Glucagón con la Seq. ID 45 (triángulos), 46 (cuadrados), 48 (círculos).

La Figura 4d muestra la concentración de glucosa en sangre en relación con la situación inicial frente al tiempo después de una inyección en varias dosis del conjugado de HA-agonista de GLP-1/Glucagón con la Seq. ID 49 (círculos).

Ejemplo 29

5 Estudio de inyectabilidad

Se preparó una suspensión de 3,75% (mg/ml) del conjugado HA-péptido dispersando una cantidad apropiada del conjugado de péptido en disolución salina tamponada con succinato 20mM (SBS) a pH 4,5. En otro vial, se preparó una disolución al 2 % (mg/ml) de polímero de HA natural disolviendo HA liofilizado en SBS 20 mM a pH 4,5. Ambas muestras se dejaron hidratar durante 24 a 48 horas a 2-8°C. Los viales se llevaron a temperatura ambiente.

10 Después de equilibrar a temperatura ambiente, se recogió 1 ml de la suspensión de conjugado de péptido-hidroge HA y se recogió HA en una jeringa de 3 ml. A esta suspensión se le añadieron 0,25 ml de la disolución de HA soluble. La suspensión resultante se sometió a 20 veces de mezclado de un lado al otro entre dos jeringas de 3 ml. Se añadieron aproximadamente 220 µl de esta suspensión a una jeringa de 1 ml. A esta jeringa se le acopló una aguja de media pulgada, 30 g. Se debe asegurar que la aguja no esté cebada con este material de prueba. La jeringa que contenía la suspensión se cargó a un accesorio de jeringa del equipo Instron y el cabezal del Instron se alineó con el émbolo de la jeringa. La velocidad del cabezal se ajustó para lograr la velocidad de inyección diana. Se inició la prueba. Para cada muestra, se efectuaron tres mediciones y el resultado presentado es el promedio de estas mediciones. Los resultados de la fuerza de inyectabilidad para los distintos conjugados de péptido-hidroge de HA se exponen en la Tabla 4.

20 Tabla 4. Efecto de la modificación de HA sobre la fuerza de inyectabilidad promedio*

Tipo de compuesto	Contenido de péptido en el conjugado		Fuerza de inyectabilidad promedio (N)
	(% en peso)	(% en mol)	
Conjugado HA Seq. ID No. 26, enlazador Asn	11,0	1,2	19,1 ± 0,6
Conjugado HA Seq. ID No. 26, enlazador Asn	15,9	2,18	16,8 ± 1,8
Conjugado HA Seq. ID No. 26, enlazador Asn	21,7	2,69	13,7 ± 1,2

*n=3 por grupo; velocidad de inyección = 12 µl/s

La Figura 5 muestra la fuerza de extrusión promedio presionando el líquido por una aguja de 30G de 2,5 cm de largo acoplada a una jeringa de 1 ml. Se observa claramente que una carga de péptido superior en el hidroge de HA conduce a fuerzas de extrusión inferiores y por lo tanto potencia la inyectabilidad.

25 Ejemplo 29b

Estudio de inyectabilidad del conjugado de HA con la Seq. ID No. 45, enlazador Aib

Se rellenó una jeringa Luer-Lock de 1 ml (jeringa BD, diámetro interno de 4 mm) con aproximadamente 500 µl (460 µl en la escala de la jeringa) de la disolución de muestra y se acopló una aguja de 29G x 12,7 mm. La medición se llevó a cabo en el dinamómetro LF Plus de Lloyd Instruments. Se empujó la varilla del émbolo hasta que apareció una pequeña gotita en la punta de la aguja de 29G. La jeringa se dispuso en el portajeringa y el dinamómetro se movió para que tocara la varilla del émbolo.

30

La configuración de la medición fue: una fuerza fallida de 50 N y una velocidad de inyección de 5,8 mm/s (lo que equivale a 100 µl/s en este caso).

La medición comenzó y falló automáticamente cuando la varilla del émbolo alcanzó la parte inferior de la jeringa (la jeringa está vacía) o se alcanzó una fuerza superior a 50 N durante la medición.

35

La Tabla 5 muestra las fuerzas de inyección máximas para las diferentes concentraciones de conjugado con distintas relaciones de mezclado de HA soluble (sHA).

ES 2 759 752 T3

Tabla 5

		600 kD sHA: relaciones de mezclado de conjugado/sHA 20 mg/ml				
Conjugado [mg/ml]	Sin sHA	50:50	40:60	30:70	20:80	10:90
20	10,5 N	10 N	11,7 N	11,9 N	11,2 N	10,3 N
25	13,6 N	-	-	-	-	-
30	16,6N	12,3 N	12,1 N	12,4 N	12,6 N	12,6 N
		2600 kD sHA: relaciones de mezclado de conjugado/sHA 20 mg/ml				
30		15,5 N	14,5 N	16,1 N	14,2 N	18,5 N

Las fuerzas de inyección de 20 mg/ml 600 de disolución de kDa sHA pura fueron 13,3 N y de 2600 kDa sHA: 18,8 N.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SANOFI

<120> Profármacos que comprenden un conjugado de enlazador de agonista dual de GLP-1/Glucagón y ácido hialurónico.

<130> DE2015/071 WO PCT - 60235P WO

<150> EP 15 305 858,1

<151> 2015-06-05

<160> 60

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Término C amidado

<400> 2

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> 3

ES 2 759 752 T3

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 4

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 5

ES 2 759 752 T3

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 6

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

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 7

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 8

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

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 9

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

Gln Arg Ala Gln Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 10

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

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ser Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11

ES 2 759 752 T3

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 11

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

Gln	Arg	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 12

ES 2 759 752 T3

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

Gln Arg Ala His Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 13

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 13

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 14

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 14

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 15

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 15

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

Gln Arg Ala Gln Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ser Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 16

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 759 752 T3

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 16

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 17

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 17

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 18

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 759 752 T3

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 18

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 19

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 19

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

ES 2 759 752 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 20

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

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

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 21

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 21

ES 2 759 752 T3

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

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 22

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 22

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

Gln Lys Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 23

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 23

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 24

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

Gln Leu Ala His Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 759 752 T3

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 25

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 26

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

ES 2 759 752 T3

<210> 27

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 27

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 28

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 29

<211> 39

<212> PRT

ES 2 759 752 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 29

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

Gln	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20						25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
		35				

<210> 30

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 30

ES 2 759 752 T3

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ser Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 31

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 31

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Lys Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 32

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 32

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 33

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 34

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 759 752 T3

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 34

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 35

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

Gln Leu Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 36

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 759 752 T3

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 36

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

Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 37

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 37

ES 2 759 752 T3

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

Gln His Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 38

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 38

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

Gln Leu Ala Gln Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 39

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

Gln Leu Ala Gln Glu Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 40

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 40

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

Gln Arg Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 41

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 759 752 T3

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 41

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 42

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 42

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

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

ES 2 759 752 T3

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 43

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es D-Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 43

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 44

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 44

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

Gln Leu Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

ES 2 759 752 T3

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 45

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 45

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 46

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39) .. (39)

<223> Término C amidado

<400> 46

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

Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Ile	Xaa	Gly	Gly	Pro	Pro
		20						25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
		35				

<210> 47

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

<223> Término C amidado

<400> 47

ES 2 759 752 T3

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro Pro
20 25 30

Ser Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
35 40

<210> 48

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29).. (29)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

<223> Término C amidado

<400> 48

ES 2 759 752 T3

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Xaa Gly Pro Pro
20 25 30

Ser Xaa Pro Pro Pro Pro Pro Pro
35 40

<210> 49

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 49

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro His
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 50

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

ES 2 759 752 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 50

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

Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Ile	Xaa	Pro	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
						35

<210> 51

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

ES 2 759 752 T3

<400> 51

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Pro Gly Pro Pro
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 52

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 52

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Pro Gly Pro His
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 53

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 759 752 T3

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 53

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro Pro
20 25 30

Ser Gly Lys Pro Pro Pro Ser
35

<210> 54

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

ES 2 759 752 T3

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 54

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly His Pro
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 55

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 55

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Trp Pro
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 56

<211> 39

<212> PRT

ES 2 759 752 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 56

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly His Pro
20 25 30

Ser Gly Lys Pro Pro Pro Ser
35

<210> 57

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

ES 2 759 752 T3

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 57

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro Pro
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 58

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 58

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Gly Gly Pro Arg
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 59

<211> 39

<212> PRT

ES 2 759 752 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29).. (29)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 59

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

Gln Leu Ala Arg Asp Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Xaa Gly Pro Pro
 20 25 30

Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 60

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de exendina-4

<220>

ES 2 759 752 T3

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> bAla

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29).. (29)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Término C amidado

<400> 60

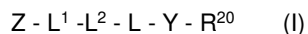
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Leu Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Arg Ala Arg Glu Phe Ile Glu Trp Leu Ile Xaa Xaa Gly Pro Pro
20 25 30

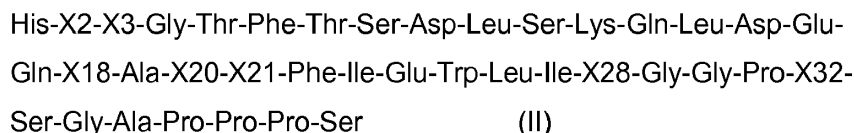
Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser
35

REIVINDICACIONES

1. Un profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable que comprende un conjugado de enlazador de fármaco de fórmula (I)



5 en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (II)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Lys

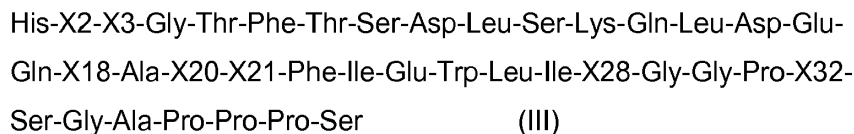
10 X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (III)



15

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Leu y His

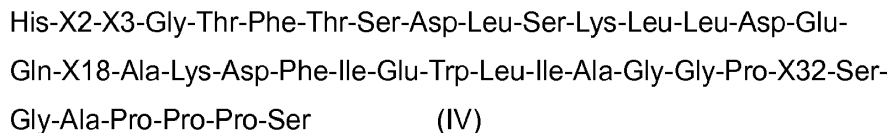
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

20 X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IV)



25

X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVa)

H₂N-His-Aib-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-X15-Glu-
 Gln-Leu-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-X29-Gly-X31-X32-
 Ser-X34-X35-Pro-Pro-Pro-X39-R²⁰ (V)

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu, preferiblemente Asp

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro, preferiblemente Gly, D-Ala

X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp, preferiblemente Pro

5 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg, preferiblemente Ser, His, Pro,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys, preferiblemente Ala, Pro

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro,

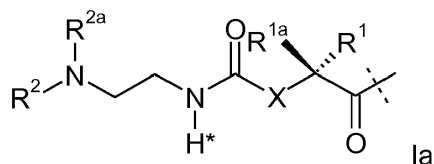
o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVb)

H₂N-His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Glu-
 Glu-Gln-Arg-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-D-Ala-Gly-
 10 Pro-Pro-Ser-D-Ala-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-R²⁰;

o su sal o solvato;

R²⁰ es OH o NH₂;

L es un enlazador de fórmula (1a),



15 en donde la línea discontinua indica la sujeción al término N de Y formando una unión amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴);

R¹, R^{1a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

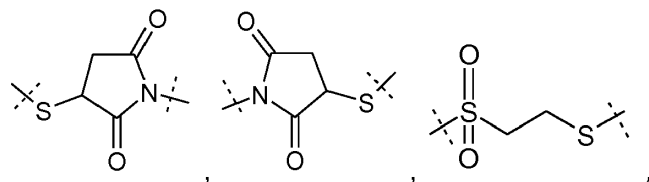
R², R^{2a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

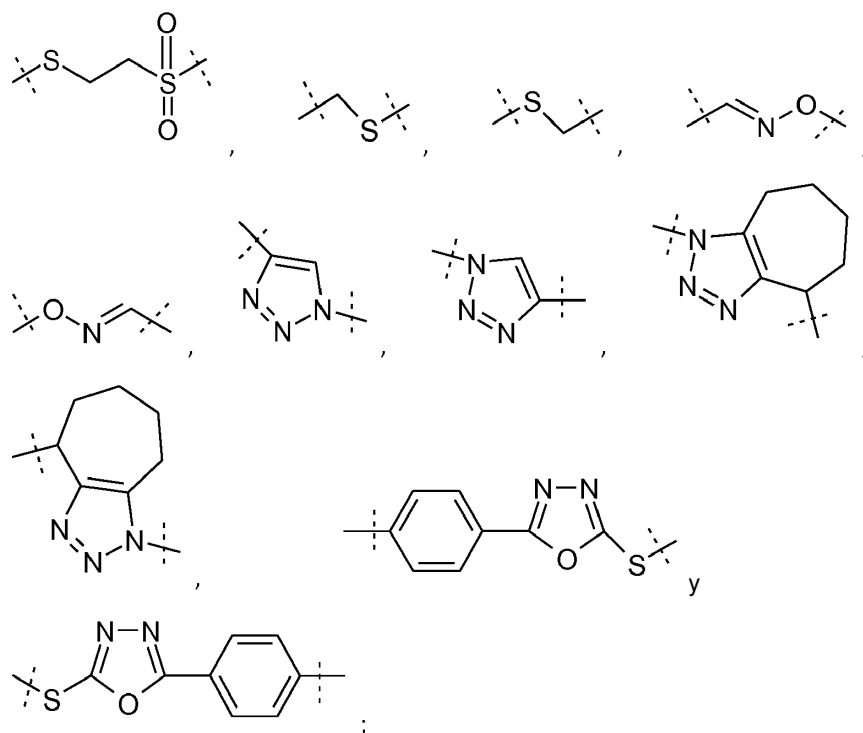
R⁴, R^{4a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

20 en donde R², R^{2a}, R⁴ o R^{4a} está sustituido con un grupo L²-L¹-Z; en donde

L² es una unión química sencilla o es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida por uno o más grupos independientemente seleccionados entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}), en donde R^{3aa} y R^{3aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

25 L² está unido a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en





5 en donde L² está unido a la posición indicada con la línea discontinua y L¹ está unido a la posición indicada con la otra línea discontinua; y

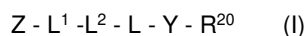
L¹ es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida por uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre -O- y C(O)N(R^{5aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{5aa}R^{5aaa}), en donde R^{5aa} y R^{5aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

L¹ está sujeto a Z mediante un grupo amino terminal que forma una unión amida con el grupo carboxi del ácido beta-1,3-D-glucurónico de Z;

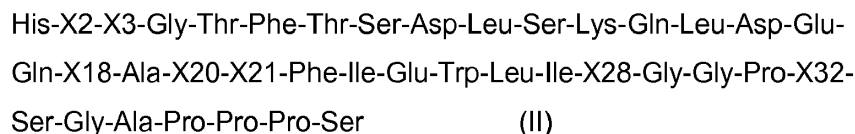
Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

0,05 a 20 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulador; y 0,2 a 8,5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

2. Un profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable que comprende un conjugado enlazador de fármaco de fórmula (I) según la reivindicación 1



en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (II)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Lys

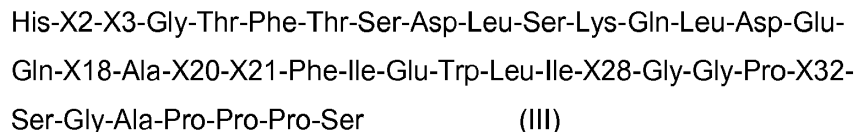
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Gln y His,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (III)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

5 X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Leu y His

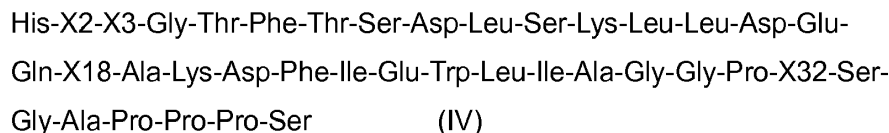
X20 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre His, Arg, Lys y Gln,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Lys, Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

10 o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IV)



X2 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, D-Ser y Aib,

X3 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gln y His,

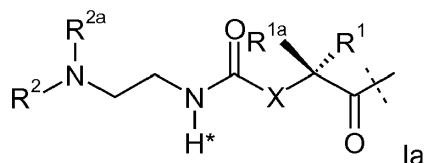
X18 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Arg y Leu,

15 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val,

o su sal o solvato;

R²⁰ es OH o NH₂;

L es un enlazador de fórmula (Ia),



20 en donde la línea discontinua indica la sujeción al término N de Y formando una unión amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴);

R¹, R^{1a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

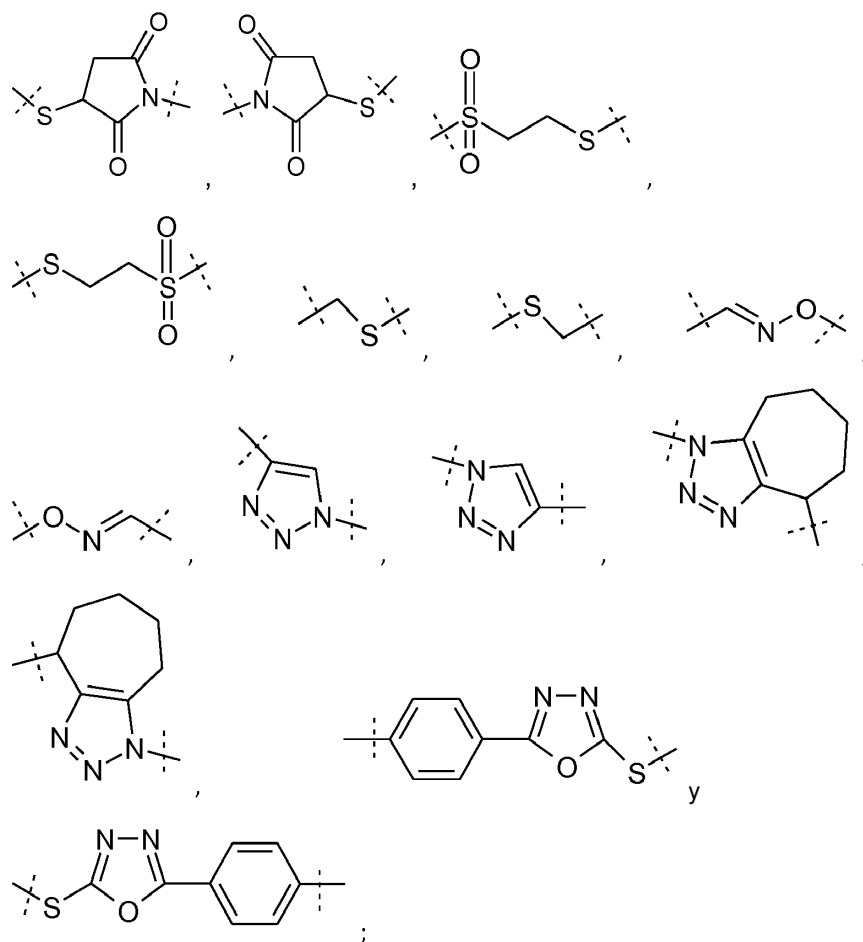
R², R^{2a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

R⁴, R^{4a}, se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄;

25 en donde R², R^{2a}, R⁴ o R^{4a} está sustituido con un grupo L²-L¹-Z; en donde

L² es una unión química sencilla o es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos independientemente seleccionados entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos seleccionados en forma independiente entre OH y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}), en donde R^{3aa} y R^{3aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

30 L² está unido a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



en donde L² está sujeto a la posición indicada con la línea discontinua y L¹ está sujeto a la posición indicada con la otra línea discontinua; y

10 L¹ es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos independientemente seleccionados entre -O- y C(O)N(R^{5aa}) y está opcionalmente sustituida con uno o más grupos independientemente seleccionados entre OH y C(O)N(R^{5aa}R^{5aaa}), en donde R^{5aa} y R^{5aaa} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

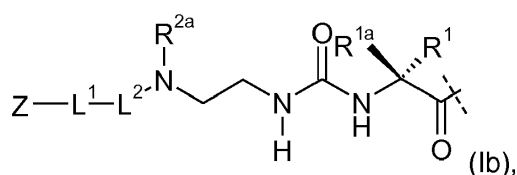
L¹ está sujeto a Z mediante un grupo amino terminal que forma una unión amida con el grupo carboxi del ácido beta-1,3-D-glucurónico del ácido hialurónico de Z;

Z es un hidrogel de ácido hialurónico reticulado, en donde

15 0,05 a 20 % de las unidades de disacárido monoméricas están reticuladas por un reticulante; y 0,2 a 8,5 % de las unidades de disacárido monoméricas portan grupos L¹-L²-L-Y-R²⁰.

3. El profármaco según la reivindicación 1, en donde

L es un resto enlazador de fórmula (Ib),



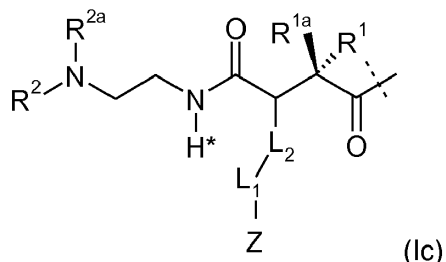
20 en donde la línea discontinua indica la sujeción a Y formando una unión amida;

R¹, R^{1a}, R^{2a} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄;

L²-L¹-Z es como se definió en la reivindicación 1.

4. El profármaco según la reivindicación 1, en donde

L es un resto enlazador -L de fórmula (Ic),



en donde la línea discontinua indica la sujeción a Y formando una unión amida;

5 R¹ y R^{1a} son H;

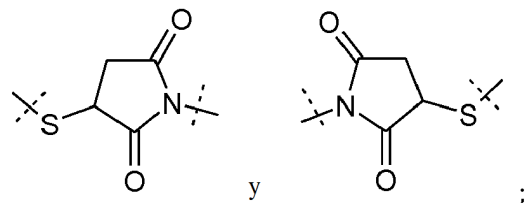
R², R^{2a} se seleccionan en forma independiente del grupo que consiste en H y CH₃;

en donde L²-L¹-Z es como se definió en la reivindicación 1.

5. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde

10 L² es una cadena de alquilo C₁₋₆, que está opcionalmente interrumpida por un grupo seleccionado entre -O- y C(O)N(R^{3aa}) y, en donde R^{3aa} se selecciona en forma independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄; y

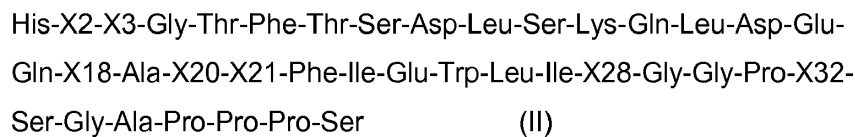
L² está sujeto a L¹ mediante un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en



en donde L² está sujeto a la posición indicada con la línea discontinua y L¹ está sujeto a la posición indicada con la otra línea discontinua.

15 6. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (II)



en donde

X2 representa D-Ser

20 X3 representa His,

X18 representa Arg

X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

25 X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val;

o en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (III)

His-X2-X3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-Asp-Glu-
Gln-X18-Ala-X20-X21-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-X28-Gly-Gly-Pro-X32-
Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (III)

en donde

X2 representa Aib,

X3 representa His,

5 X18 representa Leu,

X20 representa Lys,

X21 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu,

X28 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Ala,

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser y Val.

10 7. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVa)

H₂N-His-Aib-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-X15-
Glu-Gln-Leu-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-X29-Gly-X31-
X32-Ser-X34-X35-Pro-Pro-Pro-X39-R²⁰ (IVa)

X15 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Asp y Glu, preferiblemente Asp

X29 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly, D-Ala y Pro, preferiblemente Gly, D-Ala

15 X31 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Pro, His y Trp, preferiblemente Pro

X32 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ser, His, Pro y Arg, preferiblemente Ser, His, Pro,

X34 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Gly y D-Ala,

X35 representa un residuo de aminoácidos seleccionado entre Ala, Pro y Lys, preferiblemente Ala, Pro

X39 representa Ser o Pro-Pro-Pro.

20 8. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Y es un resto de péptido que tiene la fórmula (IVb)

H₂N-His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Glu-
Glu-Gln-Arg-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Bal-D-Ala-Gly-
Pro-Pro-Ser-D-Ala-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-R²⁰.

9. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde

Y es un agonista de GLP-1/Glucagón seleccionado de las secuencias Seq. ID No. 4 a 60.

25 10. Una composición farmacéutica que comprende un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o su sal farmacéutica junto con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica que comprende un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o su sal farmacéutica junto con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y un modificador de viscosidad.

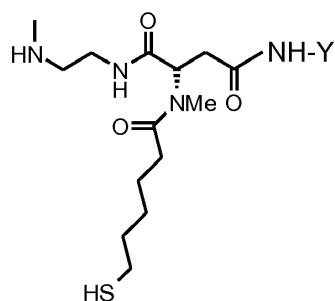
30 12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11,

en donde el modificador de viscosidad es ácido hialurónico.

13. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 12 en la forma de una formulación inyectable.

14. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 13 en la forma de una suspensión.

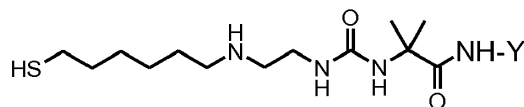
15. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 14 en la forma de una suspensión, en donde un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 tiene una concentración de 0,5 a 8 por ciento en peso/volumen.
- 5 16. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 14 en la forma de una suspensión, en donde un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 tiene una concentración de 1,5 a 3 por ciento en peso/volumen.
17. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde el profármaco se dosifica lo suficientemente en la composición como para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de agonista de GLP1/Glucagón durante por lo menos 6 días en una sola aplicación.
- 10 18. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que es una composición de una sola dosis.
19. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 18 para uso como medicamento.
20. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 18 para uso en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar con un agonista de GLP-1/Glucagón.
- 15 21. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 18 para uso en un método para tratar o prevenir diabetes.
22. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 18 para uso en un método para tratar o prevenir dislipidemia.
- 20 23. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 16 para uso en un método para tratar o prevenir síndrome metabólico.
24. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 a 18 para uso en un método para tratar o prevenir esteatosis hepática, preferiblemente enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 25 25. Un intermedio del conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón L^{2'}-L-Y de fórmula (VIII)



(VIII),

en donde Y es un péptido de Seq ID No. 4 a 60.

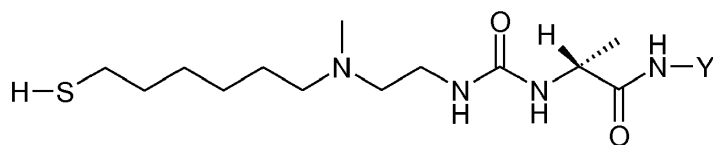
26. El intermedio del conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón L^{2'}-L-Y de fórmula (IX)



(IX)

- 30 en donde Y es un péptido de Seq ID No. 4 a 60.

27. Un intermedio del conjugado de enlazador de agonista de GLP-1/Glucagón L^{2'}-L-Y de fórmula (X)



(X),

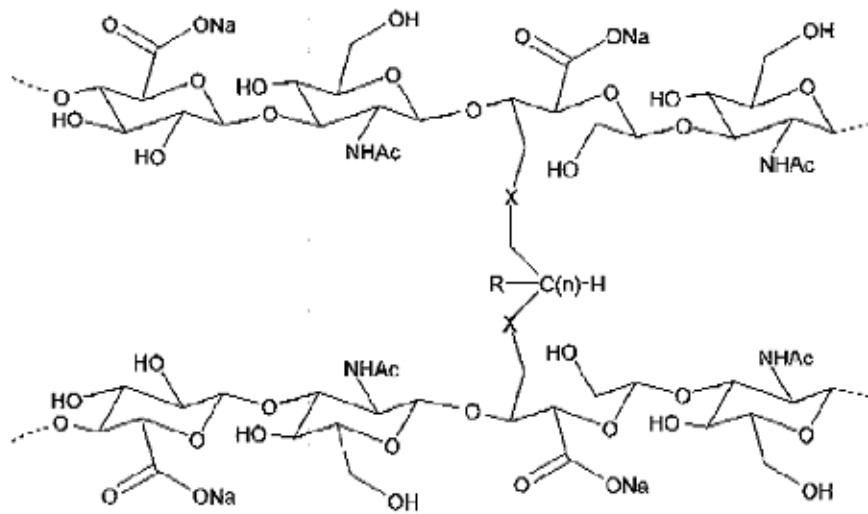
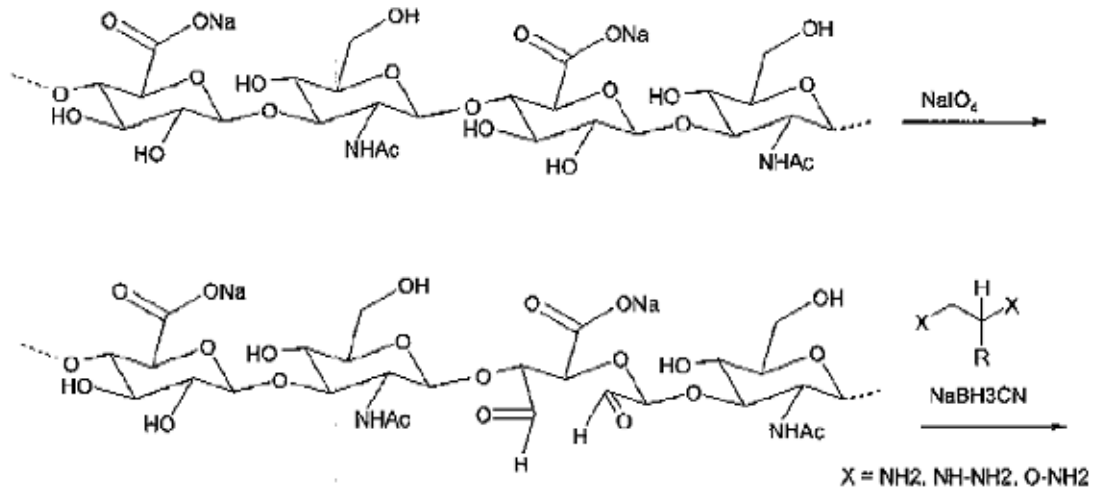
en donde Y es un péptido de Seq ID No. 4 a 60.

28. La composición según la reivindicación 18, en donde la suspensión de profármaco se puede administrar por inyección a través de una aguja de un diámetro interior de menos de 0,26 mm.

Figura 1a

Diversas químicas de reticulación para sintetizar hidrogel de HA

1) Aldeído (oxidación de diol) – aminación reductora de amina

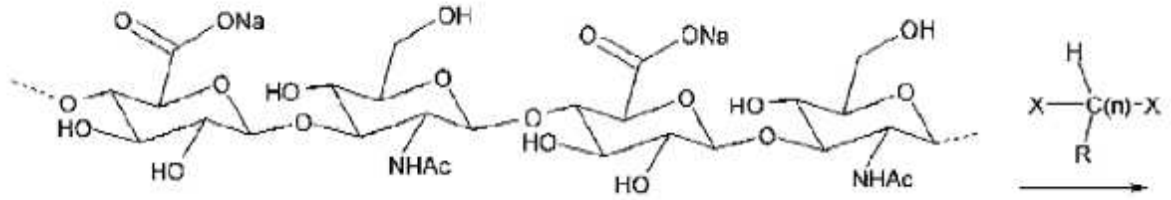


X = NH₂, NH-NH

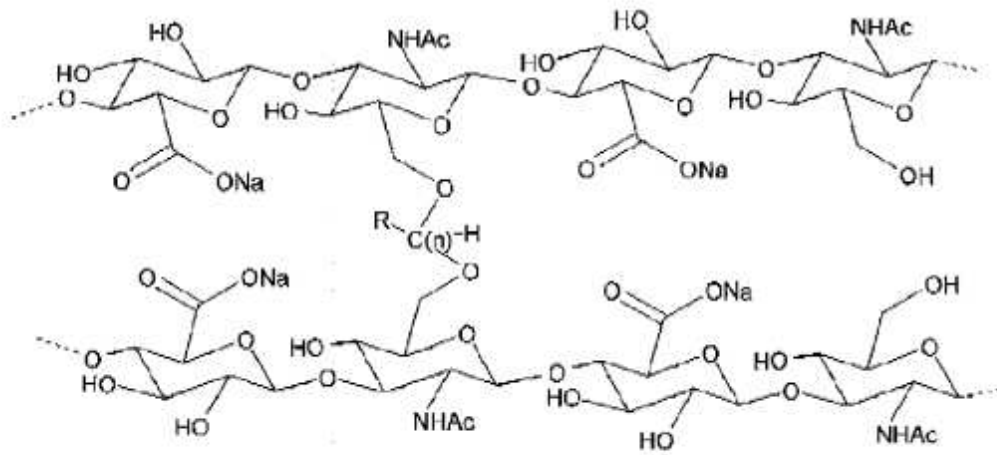
n = 1, 2, 3, etc. R = H, alquilo, arilo

Figura 1a/2

2) Alquilación mediada por hidroxilo



$n = 2, 3, 4, \text{ etc.}$ $R = \text{H, alquilo, arilo}$ $X = \text{halo, sulfonato, otro grupo saliente}$



3) Autoreticulación

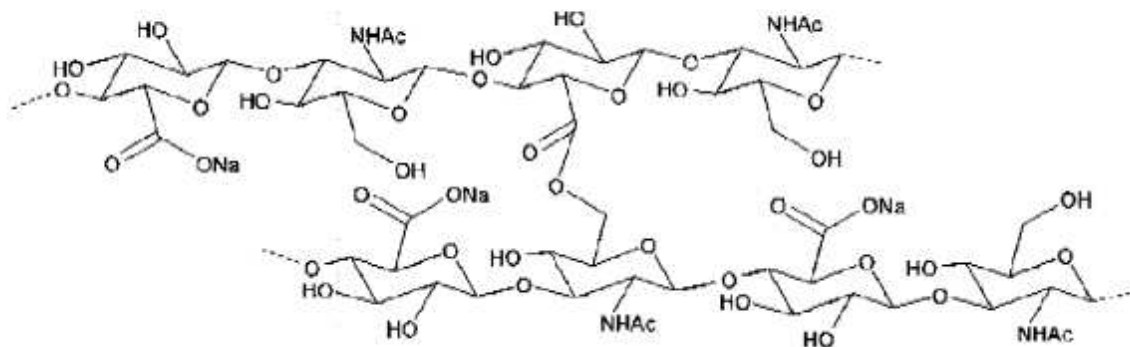
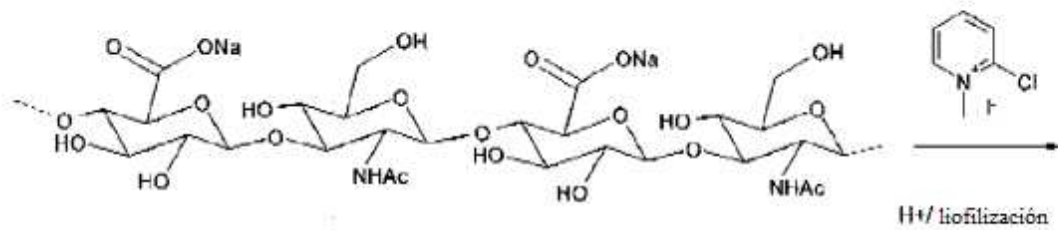


FIGURA 1b

Diversas químicas de reticulación para sintetizar hidrogel de HA

4) Reticulación de adición Michael (Tiol – maleimida)

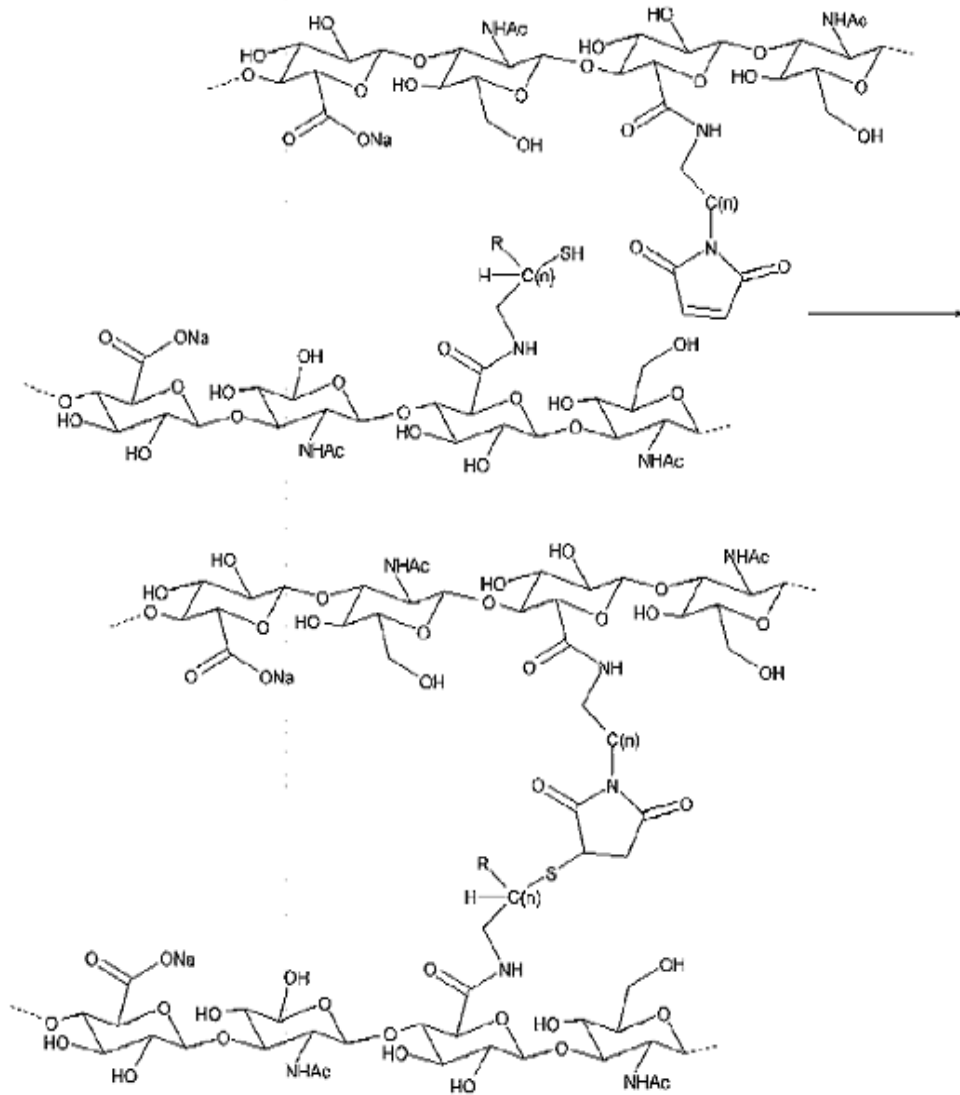
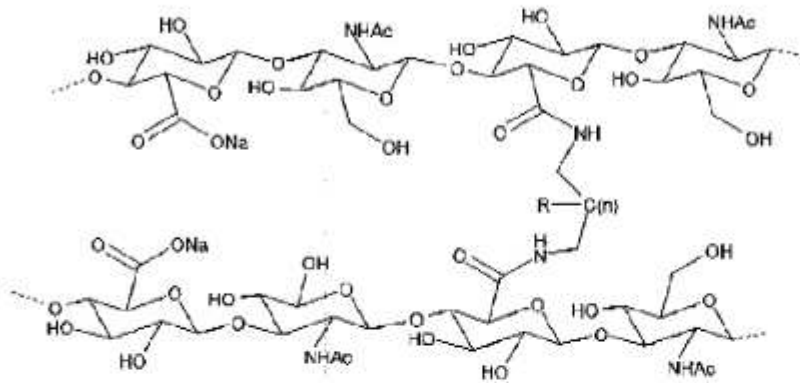
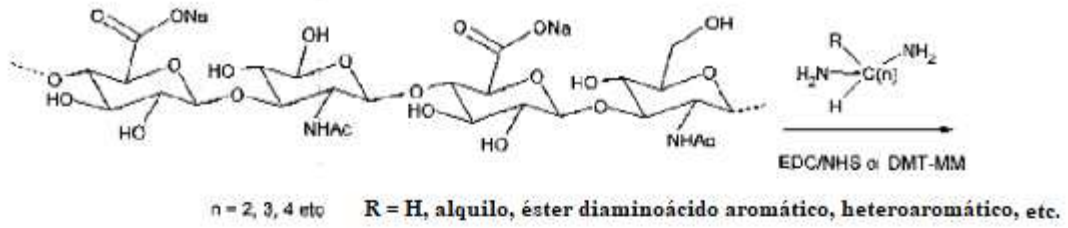


Figura 1b/2

5) Reacción de amida



6) Química de diol - epóxido

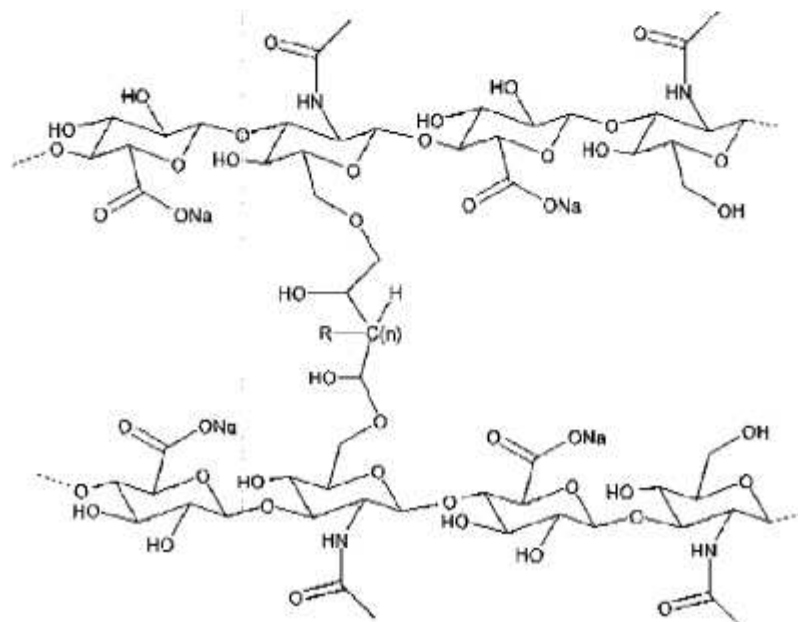
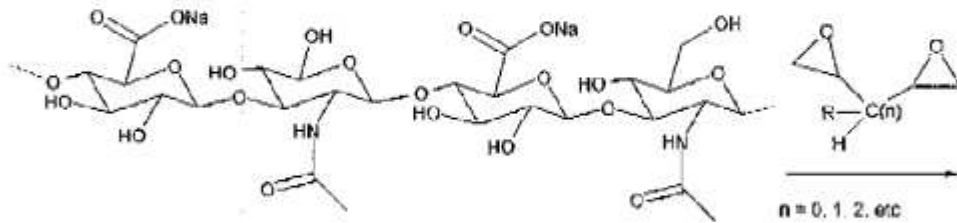


Figura 1C

Químicas Click

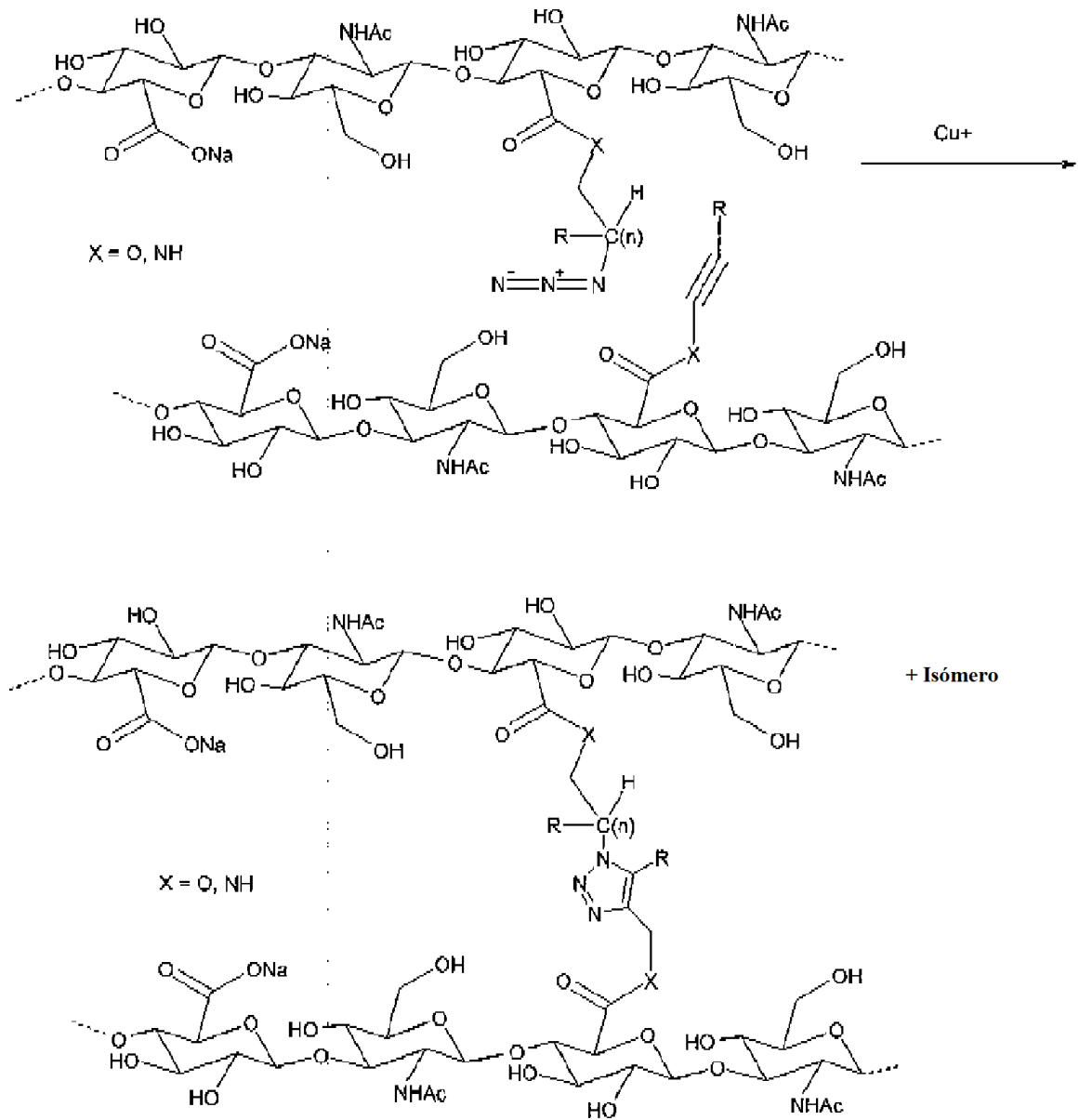


Figura 1c/2

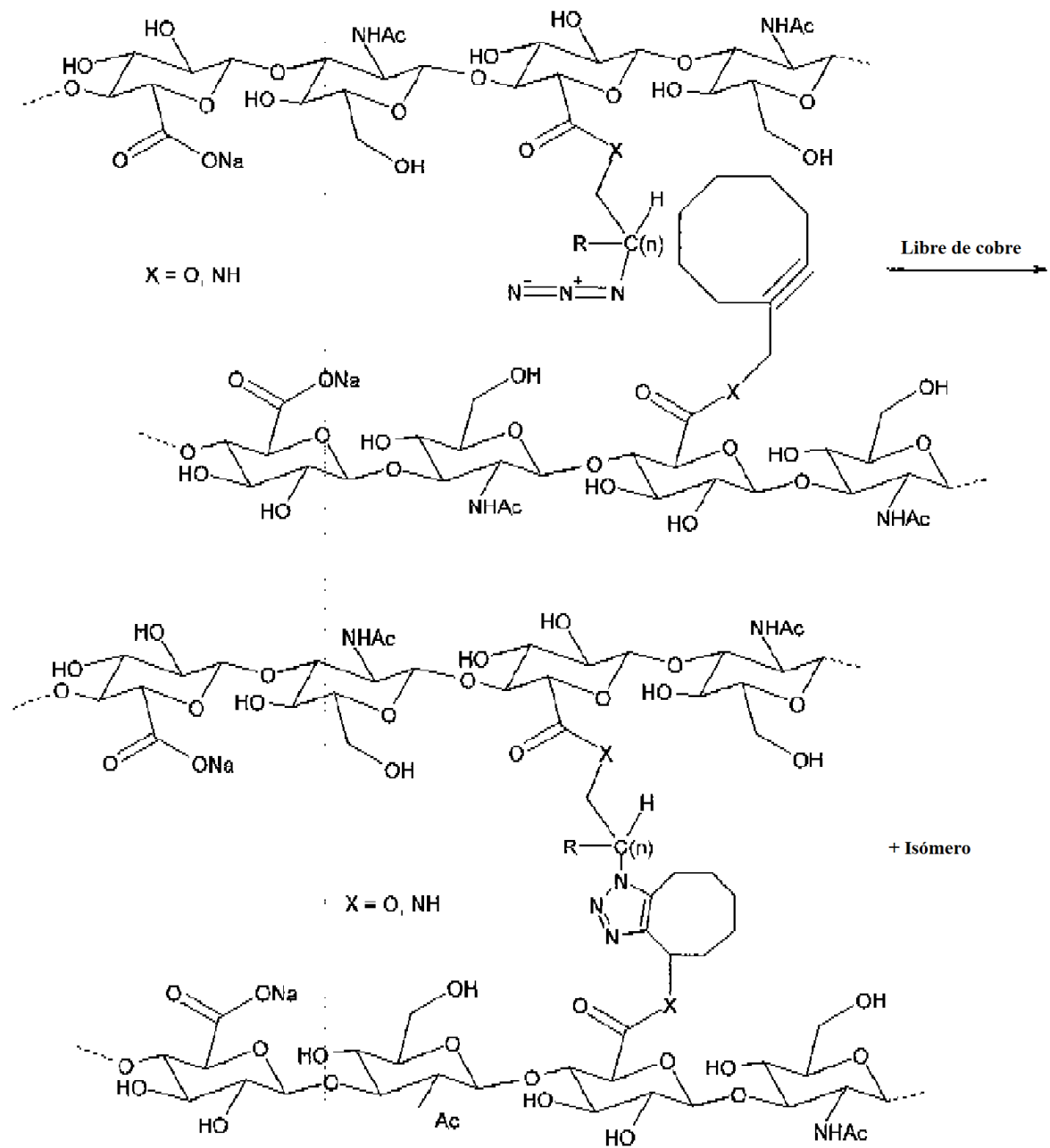


Figura 1c/3

2 + 2 Cicloadición

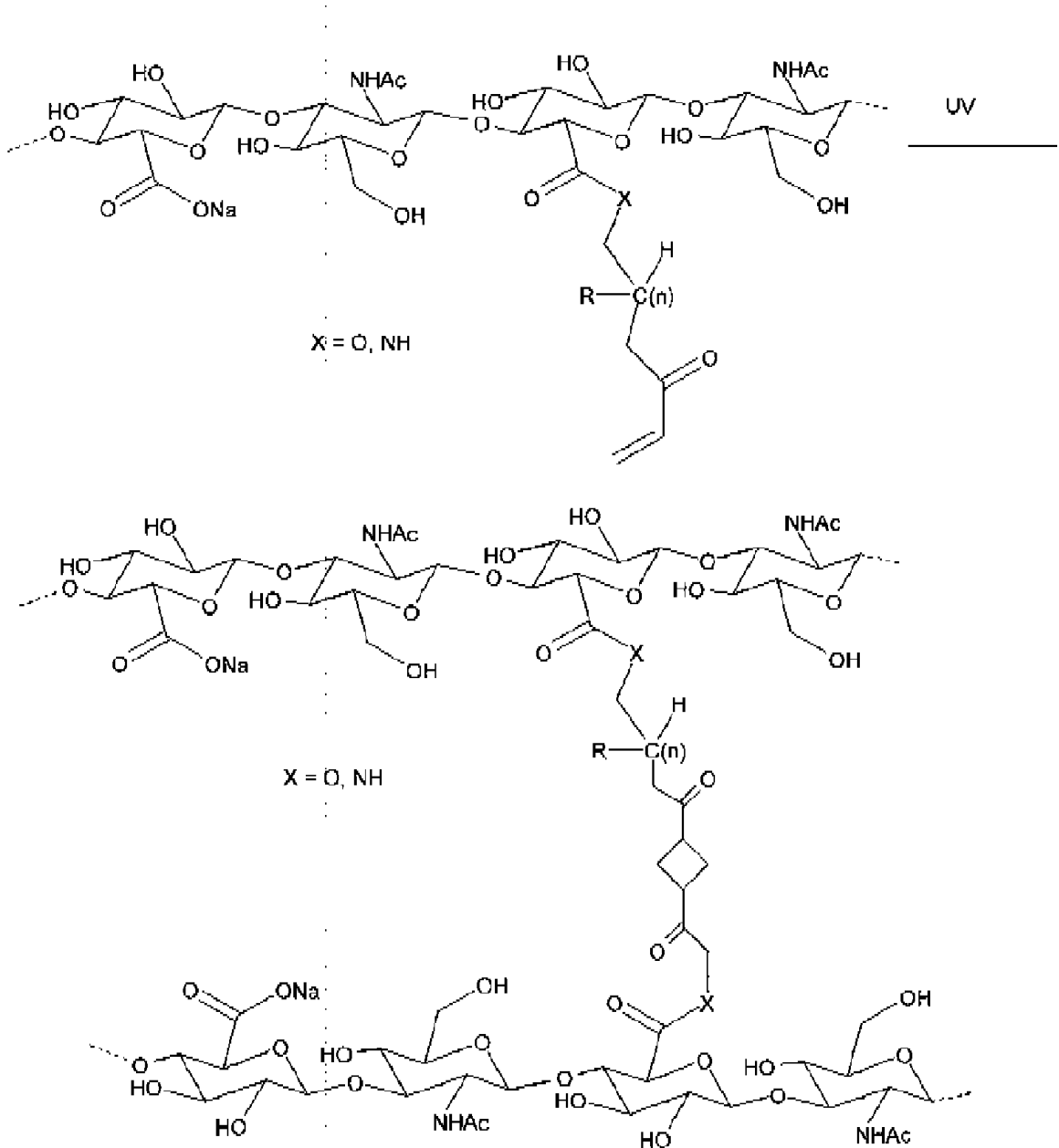


Figura 1c/4

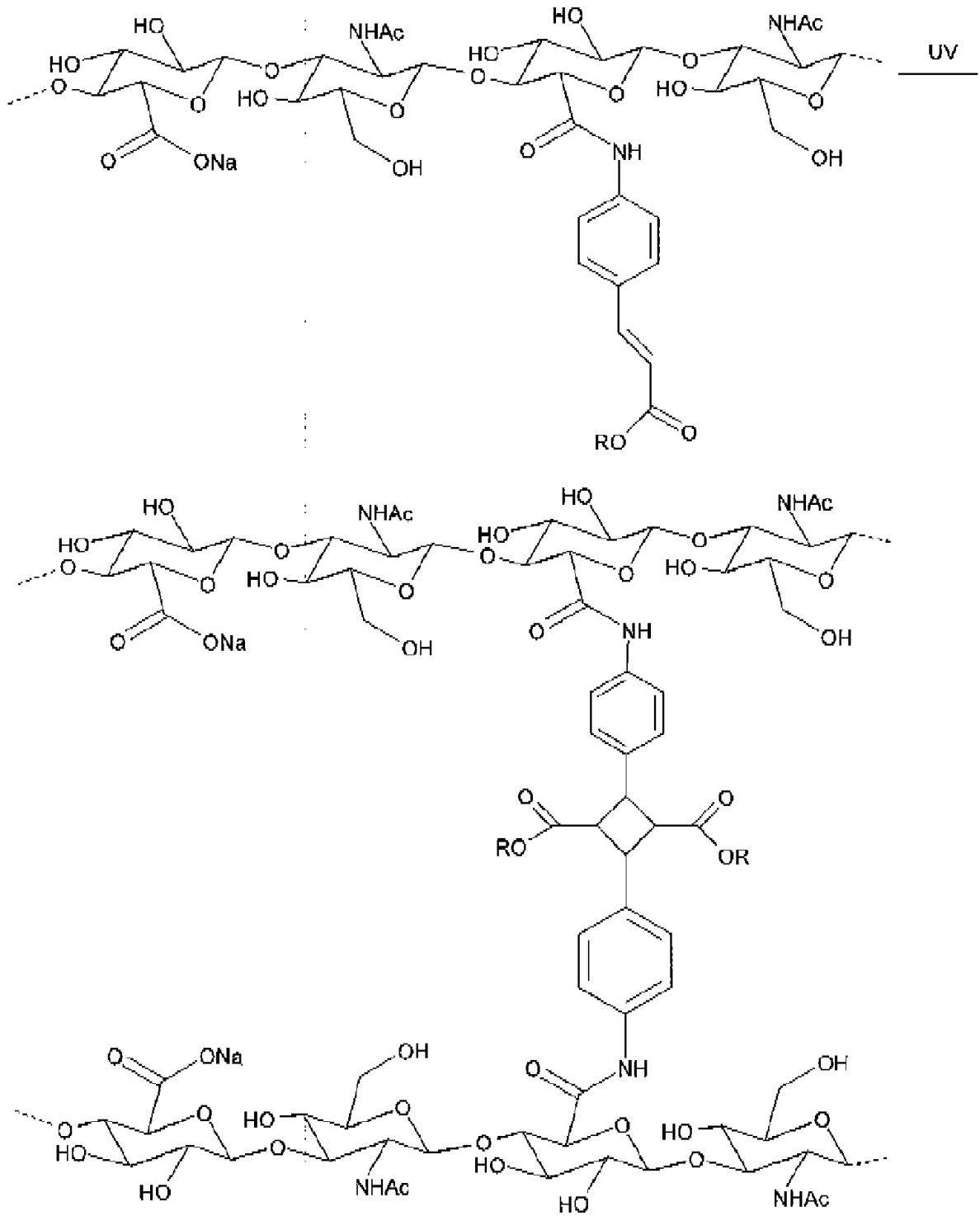


Figura 3

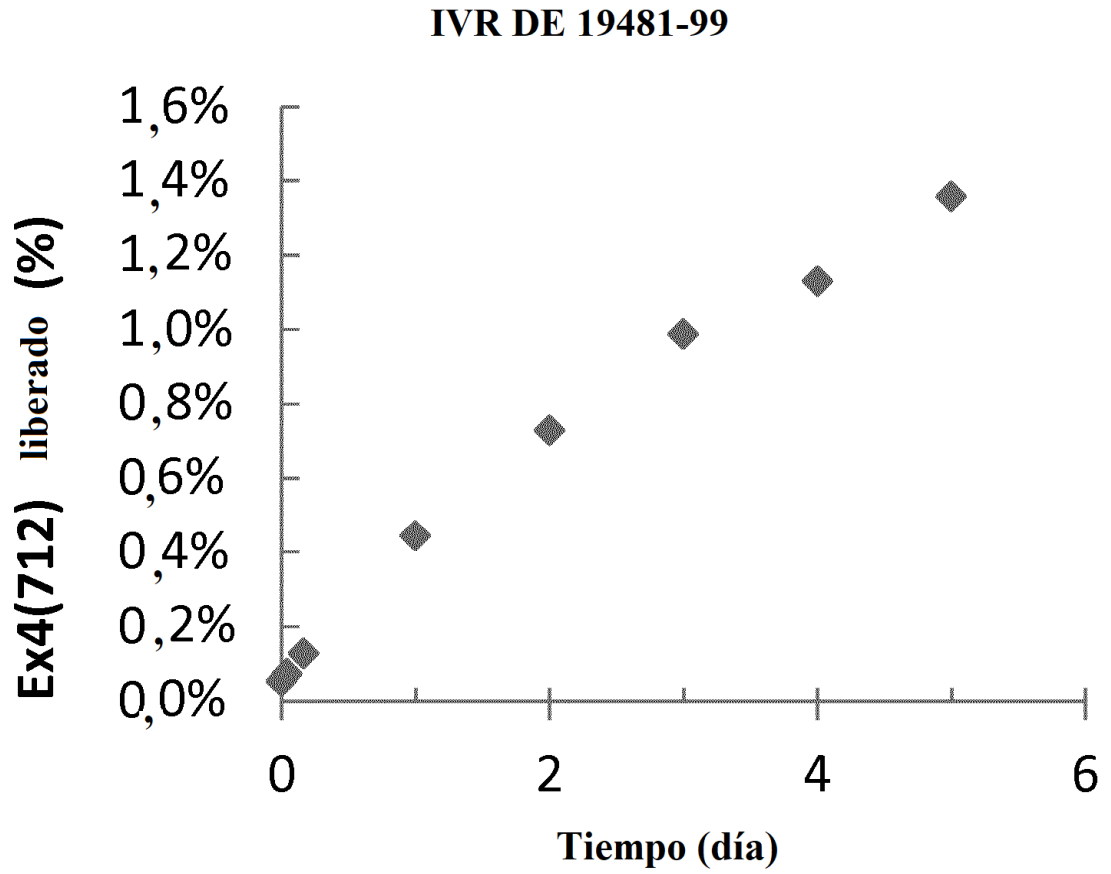


Figura 4

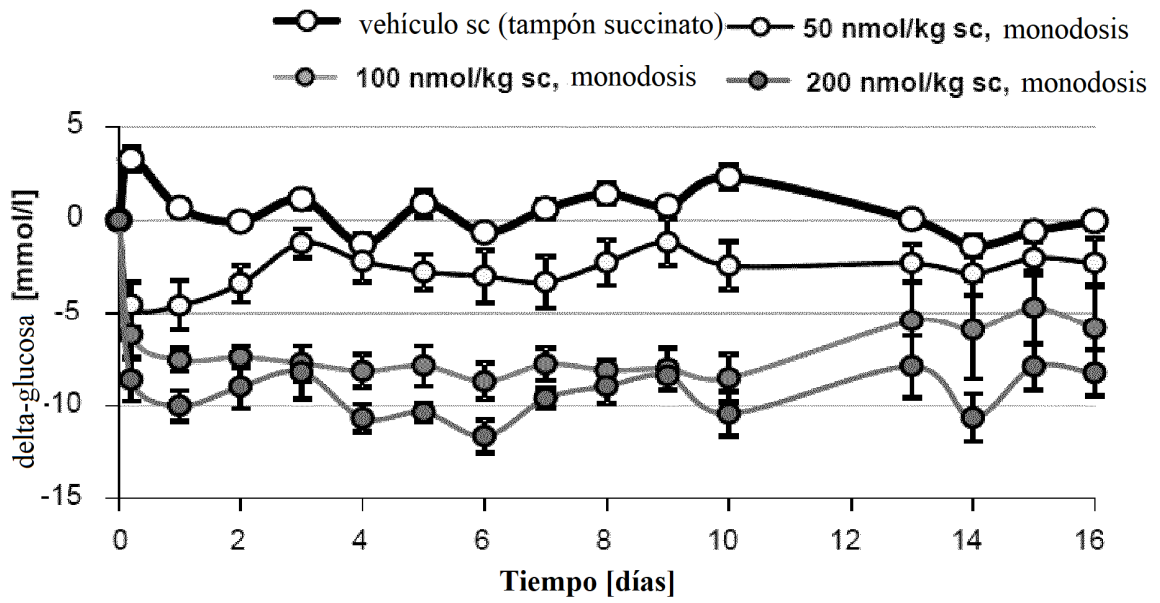


Figura 4b

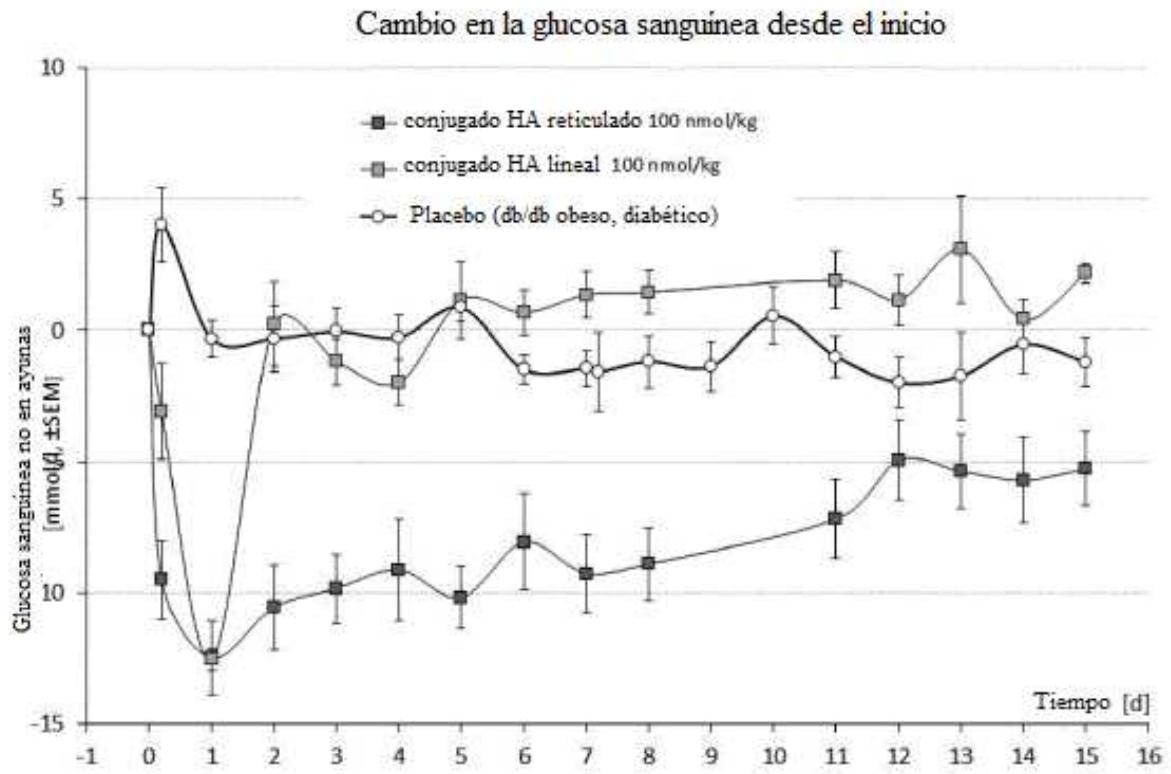


Figura 4c

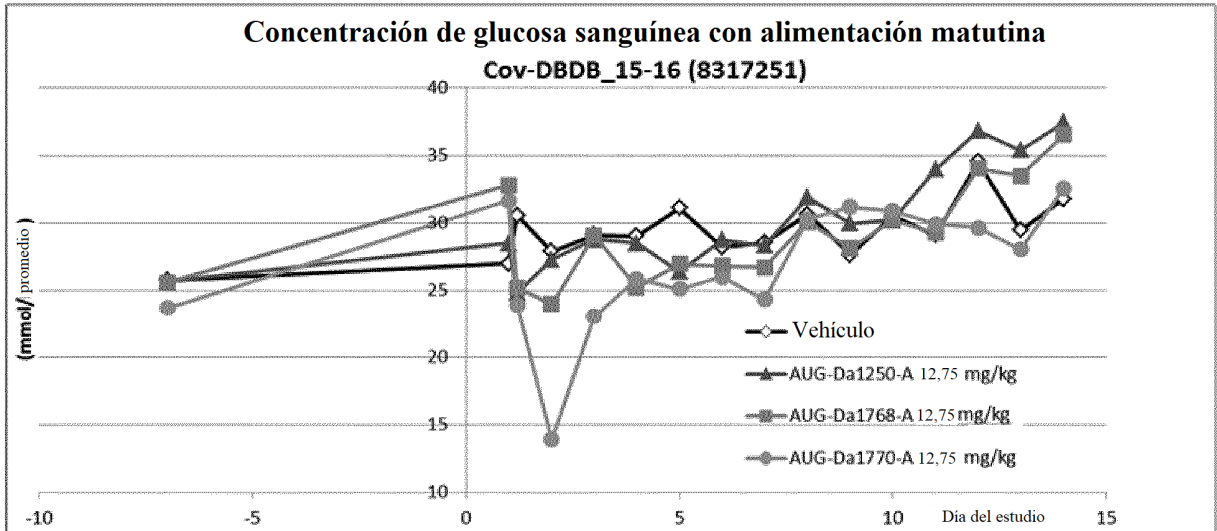


Figura 4d

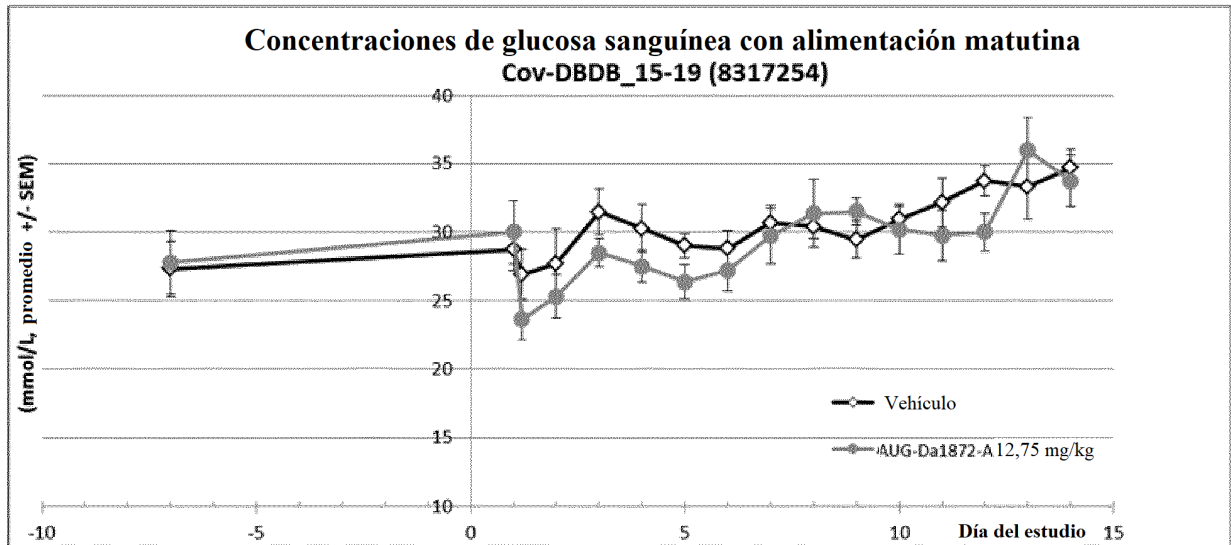


Figura 5

- aguja de 30G, 1" que usa una jeringa de 1 ml
- se mezcló 2% conjugado HA con 2% HA soluble en una relación 4:1
 - La concentración eficaz del conjugado HA es 1,6%

