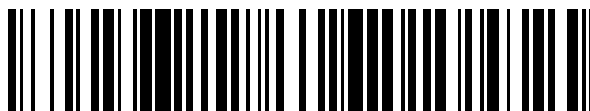


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 329**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22	(2006.01) A61K 31/365	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 31/137	(2006.01)	
A61K 31/155	(2006.01)	
C07K 14/605	(2006.01)	
A61K 38/26	(2006.01)	
A61K 31/135	(2006.01)	
A61K 31/7048	(2006.01)	
A61K 31/64	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016** **PCT/EP2016/058359**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166289**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016** **E 16717132 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3283507**

54 Título: **Análogo de glucagón acilado**

30 Prioridad:

16.04.2015 EP 15163903

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

28.05.2020

73 Titular/es:

ZEALAND PHARMA A/S (100.0%)
Sydmarken 11
2860 Søborg, DK

72 Inventor/es:

RIBER, DITTE;
TOLBORG, JAKOB LIND;
HAMPRECHT, DIETER WOLFGANG y
THOMAS, LEO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 763 329 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

Análogo de glucagón acilado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos de glucagón acilados y su uso médico, por ejemplo, en el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso, diabetes, y otros trastornos metabólicos.

10 Antecedentes de la invención

Pre-proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa diferencialmente en los tejidos para formar numerosos péptidos derivados de proglucagón relacionados estructuralmente, incluyendo glucagón (Glu), péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1), péptido 2 análogo al glucagón (GLP-2), y oxintomodulina (OXM). Estas moléculas están implicadas en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluyendo la homeostasia de la glucosa, la secreción de insulina, vaciado gástrico y crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimento.

Glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del pre-proglucagón. Oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia de 29 aminoácidos completa del glucagón con una extensión de octapéptido en el extremo carboxi (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón, y denominado "péptido 1 interviniente" o IP-1. El fragmento biológicamente activo mayor de GLP-1 se produce como un péptido amidado en el extremo C de 30 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del pre-proglucagón.

El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucosa en sangre uniéndose a los receptores de glucagón en los hepatocitos, haciendo que el hígado libere la glucosa almacenada en la forma de glucógeno mediante la glucogenolisis. A medida que estos almacenes se agotan, el glucagón estimula al hígado para sintetizar glucosa adicional mediante la gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en el torrente sanguíneo, evitando la aparición de hipoglucemia.

GLP1 disminuye los niveles elevados de glucosa en sangre mejorando la secreción de insulina estimulada por glucosa y fomenta la pérdida de peso principalmente mediante la disminución de la ingesta de alimento.

OXM se libera en la sangre en respuesta a la ingestión de alimento y en proporción al contenido calórico consumido. Se ha comprobado que OXM suprimir el apetito e inhibir la ingesta de alimento en seres humanos (Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; documento WO 2003/022304). Además de estos efectos anorécticos, que son similares a los del GLP-1 OXM debe también alterar el peso corporal mediante otro mecanismo, ya que las ratas tratadas con oxintomodulina muestran menos aumento del peso corporal que las ratas alimentadas de forma similar (Bloom Endocrinology 2004, 145, 2687). El tratamiento de roedores obesos con OXM mejora también su tolerancia a la glucosa (Parlevliet et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 294, E142-7, 2008) y suprime el aumento de peso corporal (documento WO 2003/022304).

OXM activa los receptores tanto del glucagón como de GLP1 con una potencia mayor de dos veces para el receptor del glucagón sobre el receptor de GLP-1 pero es menos potente que el glucagón y GLP-1 naturales sobre sus respectivos receptores. El glucagón humano es también capaz de activar ambos receptores, aunque con una fuerte preferencia por el receptor del glucagón sobre el receptor de GLP-1. GLP-1 por otra parte no es capaz de activar los receptores del glucagón. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no es bien conocido. En particular, no se sabe si algunos de los efectos extrahepáticos de la hormona están mediados a través de los receptores de GLP-1 y del glucagón, o a través de uno o más receptores sin identificar.

Se ha mostrado que otros péptidos se unen y activan el receptor tanto del glucagón como del GLP1 (Hjort et al, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/134340, WO 2007/100535, WO 2008/10101, WO 2008/152403, WO 2009/155257, WO 2009/155258, WO2010/070252, WO2010/070253, WO2010/070255, WO2010/070251, WO2011/006497, WO2011/160630, WO2011/160633, WO2013/092703, WO2014/041195, PCT/EP2014/072294 y PCT/EP2014/072293).

La obesidad es un problema de salud que está aumentando globalmente asociado con diversas enfermedades, especialmente las enfermedades cardiovasculares (CVD), diabetes de tipo 2, apnea del sueño obstructiva, determinados tipos de cánceres, y la artrosis. Como resultado, se ha descubierto que la obesidad reduce la expectativa de vida. De acuerdo con las proyecciones de 2005 realizadas por la Organización Mundial de la Salud existen 400 millones de adultos (de edad > 15 años) clasificados como obesos en el mundo. En Estados Unidos, se cree en la actualidad que la obesidad es la segunda causa que conduce a una muerte evitable tras el tabaquismo.

El aumento de la obesidad impulsa un aumento de la diabetes, y aproximadamente un 90 % de personas con diabetes de tipo 2 puede clasificarse como obesos. Existen 246 millones de personas en el mundo con diabetes, y en 2025 se

estima que habrá 380 millones de personas con diabetes. Muchas tienen factores de riesgo cardiovasculares adicionales, incluyendo valores altos/anómalos de LDL y triglicéridos y bajos valores de HDL.

Sumario de la invención

5

La invención proporciona compuestos que tienen la fórmula

R^1 -H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K-([17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A- R^2
en la que

10 R^1 es H (hidrógeno), alquilo C1-4, acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo y
 R^2 es OH o NH_2 ; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

El compuesto puede ser:

15 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K-([17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A- NH_2

Los compuestos de la invención pueden considerarse como análogos del glucagón. Las referencias en el presente documento a un péptido análogo a glucagón deben considerarse como referencias a un compuesto de la invención salvo que el contexto exija otra cosa.

20

Se debe considerar que la referencia a un compuesto de la invención incluye cualquier sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal de acetato o cloruro) o un solvato de la misma, salvo que se indique otra cosa o se excluya por el contexto.

25 La invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención como se define en el presente documento (incluyendo sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se ha descrito) en premezcla con un vehículo. En las realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéutica y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto puede estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

30

Los compuestos descritos en el presente documento son de utilidad, *entre otros*, en la prevención del aumento de peso o en el fomento de la pérdida de peso. Por "prevenir" se entiende inhibir o reducir cuando se compara con la ausencia de tratamiento y no se entiende que implique necesariamente un cese completo del aumento de peso. Los péptidos pueden producir una disminución en la ingesta de alimento y/o un aumento en el gasto de energía, que da como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal, los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre el control de la glucosa y/o sobre los niveles de colesterol en circulación, siendo capaces de disminuir los niveles de LDL en circulación y aumentar la relación HDL/LDL. Por tanto, los compuestos de la invención se pueden usar para la terapia directa o indirecta de cualquier dolencia producida o caracterizada por un exceso de peso corporal, tales como el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vejiga biliar relacionada con obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad. Se puede usar también para la mejora del control glucémico, o para la prevención o el tratamiento de dolencias producidas o caracterizadas por un control inadecuado de la glucosa o dislipidemia (por ejemplo, niveles de LDL elevados o relación HDL/LDL reducida), diabetes (especialmente diabetes de Tipo 2), síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular. Sus efectos en estas dolencias pueden ser como un resultado o bien estar asociados con su efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes de las mismas.

40

45

La invención proporciona también un compuesto de la invención para su uso en un método de tratamiento médico, particularmente para su uso en un método de tratamiento de una dolencia como se ha descrito anteriormente.

50

El compuesto de la invención puede administrarse como parte de un tratamiento combinado con un agente para el tratamiento de la diabetes, obesidad, dislipidemia o hipertensión.

En tales casos, los dos principios activos pueden administrarse solos o por separado, y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

55

Por tanto, el compuesto de la invención puede usarse en combinación con un agente antidiabético que incluye, aunque no de forma limitativa una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista del receptor de GLP-1, un inhibidor de SGLT2 (es decir, un inhibidor del transporte de sodio-glucosa, por ejemplo, una glifozina tal como empaglifozina, canaglifozina, dapaglifozina o ipraglifozina), un agonista de GPR40 (un agonista de FFAR1/FFA1, por ejemplo, fasiglifam), o una insulina o un análogo de insulina.

60

El compuesto puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad que incluye, aunque no de forma limitativa, un agonista del receptor 1 de GLP-1, un péptido YY o un análogo del mismo, un neuropéptido Y (NPY) o un análogo del mismo, un antagonista del receptor 1 cannabinoideo, un inhibidor de la lipasa, un péptido prolset

65

humano (HIP), el agonista 4 del receptor de la melanocortina, un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación del inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y un antagonista del receptor opioideo (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona), Orlistat™, Sibutramine™, CCK, amilina, pramlintida y leptina y análogos de los mismos, o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

El compuesto puede usarse además junto con un agente antihipertensivo que incluye, aunque no de forma limitativa, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un bloqueante del receptor de la angiotensina II, diurético, betabloqueante, o un bloqueante de los canales de calcio.

El compuesto se puede usar junto con un agente antilipídico que incluye, aunque no de forma limitativa una estatina, un fibrato, una niacina, un inhibidor de PCSK9 (Proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9) y/o un inhibidor de la absorción del colesterol.

Por tanto, la invención proporciona además una composición o un kit terapéutico que comprende un compuesto de la invención y, por ejemplo, un agente antidiabético, un agente antiobesidad, un agente antihipertensivo o un agente antilipídico como se ha descrito anteriormente. Se proporciona también dicha composición o kit terapéutico para su uso en un método de tratamiento médico, especialmente, para el tratamiento de una dolencia como se ha descrito anteriormente.

El compuesto de la invención puede prepararse mediante química sintética. Por consiguiente, la invención proporciona un método de síntesis de un compuesto de la invención.

La invención puede también prepararse mediante una combinación de métodos recombinantes y sintéticos. El método puede comprender expresar una secuencia de un péptido precursor, purificar opcionalmente el compuesto producido de esta manera, y añadir o modificar uno o más aminoácidos para producir un compuesto de la invención. La etapa de modificación puede comprender la introducción de un resto Aib (por ejemplo, mediante la modificación de un resto precursor), la introducción del sustituyente [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG en la cadena lateral del resto 28, y/o la modificación de uno o ambos grupos terminales R¹ y R², por ejemplo, mediante la introducción de un grupo amida R² en el extremo C libre.

El péptido precursor puede expresarse a partir de un ácido nucleico que codifica el péptido precursor en una célula o un sistema de expresión exento de células que comprende dicho ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

En toda esta memoria descriptiva, se usan los códigos de una letra y los códigos de tres letras convencionales para los aminoácidos de origen natural, así como las abreviaturas generalmente aceptadas para otros aminoácidos, incluyendo Aib (ácido α-aminoisobutírico).

Glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del pre-proglucagón y tiene la secuencia

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr. Oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia de 29 aminoácidos completa del glucagón con una extensión de octapéptido en el extremo carboxi (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón, que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala y se denomina "péptido 1 interviniente" o IP-1; la secuencia completa de la oxintomodulina es, por tanto, His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala). El fragmento biológicamente activo mayor de GLP-1 se produce como un péptido amidado en el extremo C de 30 aminoácidos, el péptido amidado en el extremo C que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del pre-proglucagón.

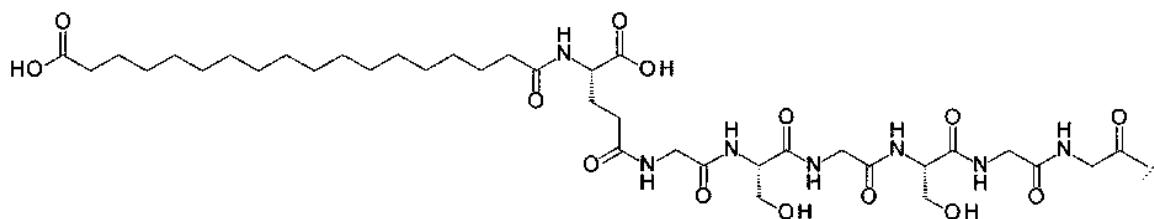
La expresión "glucagón natural" se refiere por tanto al glucagón humano natural que tiene la secuencia H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

Los aminoácidos de la secuencia lineal de los compuestos de la invención pueden considerarse como numerados consecutivamente desde el 1 al 29 en la dirección convencional del extremo N al extremo C. La referencia a una "posición" debe interpretarse en consecuencia, puesto que debe referenciar las posiciones en el glucagón humano natural y otras moléculas.

El resto en la posición 28 es un resto de lisina (Lys) que se conjuga con un sustituyente lipófilo mediante un enlace amida, a través de su grupo amino épsilon. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que el sustituyente se une a las proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina) en el torrente sanguíneo, protegiendo de esta forma los compuestos de la invención de la degradación enzimática y potenciando la semivida de los compuestos. También puede modular la potencia del compuesto, por ejemplo, con respecto al receptor de glucagón y/o al receptor

de GLP-1.

El sustituyente tiene la estructura:



El sustituyente se denomina en el presente documento mediante la notación abreviada [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG. Esto indica que puede considerarse nominalmente como compuesto de una unidad de 17-carboxi-heptadecanoilo y un separador hexapeptídico que tiene la secuencia glicina-serina-glicina-serina-glicina-glicina, unido mediante un resto de ácido glutámico en una configuración "iso" (es decir, unido mediante su grupo amino alfa a la unidad del 17-carboxi-heptadecanoilo y mediante su grupo carboxilo gamma al extremo N del separador hexapeptídico).

Se cree que la presencia del grupo ácido en el extremo de la cadena grasa potencia las propiedades farmacocinéticas del compuesto, por ejemplo, aumentando la semivida y/o el tiempo de residencia medio, y reduciendo el aclaramiento. El enlazador puede contribuir también a estas propiedades farmacocinéticas. Los enlazadores que comprenden más de una unidad de aminoácido (o restos de tamaño similar) pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas en comparación con aquellos que consisten únicamente en una unidad de aminoácido o similar. Estas propiedades pueden permitir que el compuesto se administre menos frecuentemente que un compuesto equivalente con la misma cadena principal peptídica, pero sin modificación o con una modificación diferente (por ejemplo, un sustituyente con una cadena grasa alifática que carece de un grupo polar y/o que tiene un resto enlazador más corto).

El término "conjugado" se usa aquí para describir la unión química de un resto químico identificable con otro, y la relación estructural entre dichos restos. No debe considerarse que implique ningún método de síntesis en particular.

El lector experto será muy consciente de las técnicas adecuadas que se pueden usar para llevar a cabo las reacciones de acoplamiento usando metodologías sintéticas generales relacionadas por ejemplo en "Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations", 2ª edición, Larock, R. C; Wiley-VCH: Nueva York, 1999. Dichas transformaciones pueden tener lugar en cualquier etapa adecuada durante el proceso de síntesis.

Síntesis de péptidos

Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse tanto por métodos sintéticos convencionales, sistemas de expresión recombinantes, o cualquier otro estado del método de la técnica. Por tanto, los análogos de glucagón pueden sintetizarse de numerosas maneras, incluyendo, por ejemplo, un método que comprende:

(a) sintetizar el péptido mediante metodología de fase sólida o fase líquida, tanto por etapas como mediante ensamblaje de fragmentos, y aislamiento y purificación del producto peptídico final; o

(b) expresar una secuencia peptídica precursora a partir de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido precursor, recuperar el producto de expresión, y modificar el péptido precursor para dar como resultado un compuesto de la invención.

La expresión se lleva a cabo normalmente a partir de un ácido nucleico que codifica el péptido precursor, que se puede llevar a cabo en una célula o un sistema de expresión exento de células que comprende dicho ácido nucleico.

Se prefiere sintetizar los análogos de la invención mediante síntesis de péptidos en fase sólida o fase líquida. En este contexto, se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". En: Synthetic Peptides (2ª Edición), y los Ejemplos del presente documento.

Para la expresión recombinante, los fragmentos de ácidos nucleicos que codifican el péptido precursor se insertarán normalmente en vectores adecuados para formar vectores de clonación o de expresión. Los vectores pueden, según el objetivo y el tipo de aplicación, estar en forma de plásmidos fagos, cósmidos, minicromosomas, o virus, pero también como ADN puro que se expresa solo transitoriamente en determinadas células. Los vectores de clonación y expresión preferidos (vectores plásmidos) son capaces de replicación autónoma, lo que permite por tanto números altos de copias para los fines de expresión de alto nivel o replicación de alto nivel para la clonación posterior.

En un resumen general, un vector de expresión comprende las siguientes características en la dirección 5' a 3' y en un enlace operativo: un promotor para impulsar la expresión del fragmento de ácido nucleico, opcionalmente una

secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder que permite la secreción (a la fase extracelular o, cuando sea aplicable, al periplasma), codificando el fragmento de ácido nucleico el péptido precursor, y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador. Puede comprender características adicionales tales como marcadores seleccionables y orígenes de replicación. Cuando se trabaja con vectores de expresión en cepas productoras o líneas de células, puede preferirse que el vector pueda integrarse en el genoma de la célula hospedadora. La persona experta está muy familiarizada con los vectores adecuados y es capaz de diseñar uno de acuerdo con sus necesidades específicas.

Los vectores de la invención se usan para transformar células hospedadoras para producir el péptido precursor. Dichas células transformadas pueden ser células o líneas de células cultivadas usadas para la propagación de los fragmentos y vectores de ácidos nucleicos, y/o usarse para la producción recombinante de los péptidos precursores.

Las células transformadas preferidas son microorganismos tales como bacterias [tales como las especies *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*), *Salmonella*, o *Mycobacterium* (preferentemente no patógeno, por ejemplo, *M. bovis* BCG), levaduras, (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), y protozoos. Como alternativa, las células transformadas pueden derivarse de un organismo multicelular, es decir, puede ser una célula fúngica, una célula de insecto, una célula de alga, una célula vegetal, o una célula animal tal como una célula de mamífero. Para los fines de la clonación y/o la expresión optimizada se prefiere que la célula transformada pueda replicar el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el fragmento de ácido nucleico se pueden usar para la preparación a pequeña escala o a gran escala de los péptidos de la invención.

Cuando se produce el péptido precursor por medio de células transformadas, es conveniente, aunque lejos de ser esencial, que el producto de expresión se secrete en el medio de cultivo.

Eficacia

La unión de los compuestos relevantes a los receptores de GLP-1 o glucagón (Glu) se puede usar como una indicación de la actividad agonista, pero en general se prefiere usar un ensayo biológico que mida la señalización intracelular producida por la unión del compuesto al receptor relevante. Por ejemplo, la activación del receptor del glucagón mediante un agonista de glucagón estimulará la formación de AMP cíclico celular (AMPC). De forma similar, la activación del receptor de GLP-1 por un agonista de GLP-1 estimulará la formación de AMPC. Por tanto, la producción de AMPC en células adecuadas que expresan uno de estos dos receptores se puede usar para vigilar la actividad receptora relevante. El uso de una pareja adecuada de tipos celulares, expresando cada uno un receptor, pero no el otro, puede usarse por tanto para determinar la actividad agonista hacia ambos tipos de receptores.

La persona experta será consciente de los formatos de ensayo adecuados, y se proporcionan ejemplos más adelante. El receptor de GLP-1 y/o el receptor del glucagón pueden tener la secuencia de los receptores que se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden emplear el receptor del glucagón humano (Glucagón-R) que tiene el número de registro primario GI:4503947 y/o el receptor del péptido 1 análogo a glucagón humano (GLP-1 R) que tiene el número de acceso primario GI:166795283. (en lo que respecta a las secuencias de las proteínas precursoras que se citan, debe por supuesto entenderse que los ensayos pueden utilizar la proteína madura, que carece de la secuencia de señalización).

Se pueden usar los valores de la CE_{50} como una medida numérica de la potencia del agonista en un receptor dado. Un valor de la CE_{50} es una medida de la concentración de un compuesto requerida para conseguir la actividad máxima de la mitad de los compuestos en un ensayo concreto. Por tanto, por ejemplo, puede considerarse que un compuesto que tiene EC_{50} [GLP-1] menor que la CE_{50} [GLP-1] de glucagón en un ensayo concreto tiene una potencia agonista mayor del receptor de GLP-1 que el glucagón.

Los compuestos descritos en esta memoria descriptiva son normalmente agonistas dobles de GluGLP-1, como se determina mediante la observación de que son capaces de estimular la formación de AMPC en el receptor del glucagón y el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor puede medirse en ensayos independientes y posteriormente compararse entre sí.

Comparando el valor de la CE_{50} para el receptor de GLP-1 (CE_{50} de [GLP-1-R]) con el valor de la CE_{50} para el receptor de Glucagón, (CE_{50} de [Glucagón-R]) para un compuesto dado, la selectividad relativa a GLP-1 R puede calcularse del siguiente modo:

$$\text{Selectividad relativa a GLP-1 R [compuesto]} = (CE_{50} \text{ [GLP-1 R]}) / (CE_{50} \text{ [Glucagón-R]})$$

El término " CE_{50} " se aplica a la mitad de la concentración eficaz máxima, normalmente a un receptor concreto, o sobre el nivel de un marcador concreto para la función del receptor y puede referirse a una actividad inhibidora o una actividad antagonista, dependiendo del contexto bioquímico específico.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, la selectividad relativa de un compuesto puede permitir su efecto sobre el receptor del GLP-1 o el glucagón para compararlo directamente con su efecto sobre el otro receptor.

Por ejemplo, cuanto mayor sea la selectividad relativa a GLP-1 de un compuesto, más eficaz puede ser este compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor del glucagón. Normalmente, los resultados se comparan para los receptores del glucagón y el GLP-1 de la misma especie, por ejemplo, los receptores del glucagón y del GLP-1 humanos, o los receptores del glucagón y del GLP-1 de murino.

Los compuestos de la invención pueden tener una selectividad relativa a GLP-1R mayor que el glucagón humano en que, para un nivel concreto de actividad agonista del glucagón-R, el compuesto puede presentar un nivel mayor de actividad agonista de GLP-1 R (es decir, una potencia mayor en el receptor de GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la potencia absoluta de un compuesto concreto en los receptores del glucagón y GLP-1 puede ser mayor, menor o aproximadamente igual a la del glucagón humano natural, siempre que se consiga la selectividad relativa a GLP-1 R adecuada.

No obstante, los compuestos de la presente invención pueden tener una CE_{50} de [GLP-1 R] menor que el glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} de [GLP-1-R] menor que la del glucagón manteniendo a la vez una CE_{50} [Glucagón-R] que es menor de 100 veces mayor que la del glucagón humano, menor de 50 veces mayor que el del glucagón humano, o menor que 10 veces mayor que el del glucagón humano.

Los compuestos de la invención pueden tener una CE_{50} del [Glucagón-R] que es menor que cien veces la del glucagón humano. Los compuestos pueden tener un valor de CE_{50} [Glucagón-R] que es menos de cien veces (por ejemplo, menos de 50 veces) el del glucagón humano, y tener un valor de la CE_{50} [GLP-1 R] que es menos de la mitad del del glucagón humano, menos de un quinto que el del glucagón humano, menos de un décimo que el del glucagón humano, o menos de centésimo que el del glucagón humano, por ejemplo, entre 0,01 y 0,1 veces el del glucagón, por ejemplo, entre 0,01 y 0,05 veces el del glucagón humano.

La selectividad relativa de GLP-1 R de los compuestos puede estar comprendida entre 0,05 y 20. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una selectividad relativa de 0,05-0,20, 0,1-0,30, 0,2-0,5, 0,3-0,7, o 0,5-1,0; 1,0-2,0, 1,5-3,0, 2,0-4,0 o 2,5-5,0; o 0,05-20, 0,075-15, 0,1-10, 0,15-5, 0,75-2,5 o 0,9-1,1.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable que el valor de la CE_{50} de cualquier compuesto dado para el Glucagón-R o GLP-1 R (por ejemplo, para el receptor de glucagón o GLP-1 humano) sea de menos de 1 nM. En particular, puede ser deseable que el valor de la CE_{50} para el GLP-1 R (por ejemplo, para el receptor de GLP-1 humano) sea de menos de 1 nM.

Usos terapéuticos

Los compuestos de la presente invención pueden suponer opciones atractivas para el tratamiento o la prevención de, entre otros, obesidad y enfermedades metabólicas entre las que se incluye la diabetes, como se analiza a continuación.

La diabetes comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia resultado de un defecto en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambos. Los signos agudos de diabetes incluyen producción excesiva de orina, dando como resultado una sed y mayor ingesta de fluidos como compensación, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, letargia, y cambios en el metabolismo energético. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con daños a largo plazo, disfunción, y fracaso de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La diabetes se clasifica en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional sobre la base de las características patogenéticas.

La diabetes de tipo 1 representa el 5-10 % de todos los casos de diabetes y está producida por una destrucción autoinmunitaria de las células β pancreáticas secretoras de insulina.

La diabetes de tipo 2 representa el 90-95 % de los casos de diabetes y es resultado de un conjunto complejo de trastornos metabólicos. La diabetes de tipo 2 es la consecuencia de que la producción endógena de insulina sea insuficiente para mantener los niveles de glucosa plasmáticos por debajo de los umbrales de diagnóstico.

La diabetes gestacional se refiere a cualquier grado de intolerancia a la glucosa identificada durante el embarazo.

La prediabetes incluye una alteración de la glucosa en ayunas y una alteración de la tolerancia a la glucosa y se refiere a aquellos estados que se producen cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, pero por debajo de los niveles que se establecen para el diagnóstico clínico de la diabetes.

Una importante proporción de personas con diabetes de tipo 2 y prediabetes tienen mayor riesgo de morbilidad y mortalidad debido a la elevada prevalencia de factores de riesgo metabólicos adicionales que incluyen obesidad abdominal (exceso de tejido graso alrededor de los órganos abdominales internos), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea entre los que se incluyen valores elevados de triacilglicéridos, valores bajos de colesterol HDL y/o valores altos de colesterol LDL, que fomentan la acumulación de placas en las paredes arteriales), tensión arterial alta (hipertensión), un estado protrombótico (por ejemplo, valores altos de inhibidor o activador del

fibrinógeno o plasminógeno 1 en sangre), y un estado proinflamatorio (por ejemplo, valores altos de proteína C reactiva en sangre).

Por el contrario, la obesidad transmite un aumento en el riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes de tipo 2, así como, por ejemplo, algunos tipos de cánceres, apnea del sueño obstructiva, y enfermedad de la vesícula biliar.

La dislipidemia está asociada con un aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular. La lipoproteína de alta densidad (HDL) es de importancia clínica porque existe una correlación inversa entre las concentraciones de HDL en plasma y el riesgo de enfermedad aterosclerótica. La mayoría del colesterol almacenado en las placas ateroscleróticas procede del LDL y, por tanto, concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) están estrechamente relacionadas con la aterosclerosis. La relación HDL/LDL es un indicador de riesgo clínico para la aterosclerosis y la aterosclerosis coronaria, en particular.

El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Incluyen obesidad abdominal (exceso de tejido graso alrededor de los órganos abdominales internos), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea entre los que se incluyen valores elevados de triacilglicéridos, valores bajos de colesterol HDL y/o valores altos de colesterol LDL, que fomentan la acumulación de placas en las paredes arteriales), tensión arterial alta (hipertensión), resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (por ejemplo, valores altos de inhibidor o activador del fibrinógeno o plasminógeno 1 en sangre), y un estado proinflamatorio (por ejemplo, valores altos de proteína C reactiva en sangre).

Los individuos con síndrome metabólico tienen mayor riesgo de cardiopatía coronaria y otras enfermedades relacionadas con otras manifestaciones de la arteriosclerosis (por ejemplo, ictus y valvulopatía periférica). Los factores de riesgo subyacentes principales de este síndrome parecen ser la obesidad abdominal.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que los compuestos de la invención actúan como agonistas dobles tanto sobre el receptor de glucagón humano como sobre el receptor de GLP1 humano, abreviado aquí como agonistas de GluGLP-1. El agonista doble puede combinar el efecto del glucagón, por ejemplo, sobre el metabolismo de las grasas, con el efecto de GLP-1, por ejemplo, sobre los niveles de glucosa en sangre e ingesta de alimentos. Por tanto, pueden actuar para acelerar la eliminación de tejido adiposo en exceso, inducir una pérdida de peso sostenible, y mejorar el control glucémico. Los agonistas de GluGLP-1 doble también pueden actuar para reducir los factores de riesgo cardiovascular tales como niveles elevados de colesterol, niveles elevados de colesterol LDL o una relación de colesterol HDL/LDL baja.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse, de esta forma, en un sujeto que lo necesita como agentes farmacéuticos para prevenir el aumento de peso, fomentar la pérdida de peso, reducir el exceso de peso corporal o tratar la obesidad (por ejemplo mediante el control del apetito, alimentación, ingesta de alimento, ingesta calórica, y/o el gasto de energía), incluida la obesidad mórbida, así como enfermedades y dolencias sanitarias asociadas que incluyen aunque no de forma limitativa la inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vejiga biliar relacionada con obesidad y apnea del sueño inducida por obesidad.

Los compuestos pueden ser útiles para fomentar la pérdida de peso o evitar el aumento de peso en sujetos afectados por dolencias caracterizadas por un control inadecuado del apetito o sobreingesta de otro tipo, tales como el trastorno de ingesta compulsiva y el síndrome de Prader-Willi.

Los compuestos pueden ser útiles para fomentar la pérdida de peso o evitar el aumento de peso en sujetos afectados por dolencias o factores de riesgo asociados, tales como diabetes, dislipidemia, hipertensión y apnea del sueño.

Los compuestos de la invención también se pueden usar para la mejora del control glucémico y en la prevención o el tratamiento de dolencias producidas o asociadas con una alteración en el control de la glucosa, incluidos síndrome metabólico, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, prediabetes, aumento de glucosa en ayunas, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica e ictus, en un sujeto que lo necesita. Algunas de estas dolencias se pueden asociar con la obesidad. Sin embargo, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas dolencias pueden estar mediados, en todo o en parte, por un efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

El efecto sinérgico de los agonistas dobles de GluGLP-1 puede también dar como resultado una disminución de los factores de riesgo cardiovasculares tales como valores elevados de colesterol y LDL, que pueden ser totalmente independientes de su efecto sobre el peso corporal.

La invención proporciona también un compuesto de la invención para su uso en un método de tratamiento médico, particularmente para su uso en un método de tratamiento de una dolencia como se ha descrito anteriormente.

Los compuestos descritos se pueden usar para tratar la diabetes, esp. la diabetes de tipo 2.

En una realización específica, la presente invención, proporciona un compuesto como se ha descrito, para su uso en el

tratamiento de la diabetes, esp. la diabetes de tipo 2, en un individuo que lo necesita.

Los compuestos descritos se pueden usar en la prevención del aumento de peso o en el fomento de la pérdida de peso.

5 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto, como se describe, para su uso en la prevención del aumento de peso o en el fomento de la pérdida de peso en un individuo que lo necesita.

10 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe, para su uso en un método de tratamiento de una dolencia producida o caracterizada por un exceso de peso corporal, por ejemplo el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, obesidad mórbida, obesidad mórbida anterior a cirugía, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vejiga biliar relacionada con obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, prediabetes, diabetes, esp. la diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular, en un individuo que lo necesita.

Los compuestos descritos se pueden usar en un método para disminuir los niveles de LDL en circulación, y/o para aumentar la relación HDL/LDL.

20 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe, para su uso en un método para disminuir los niveles de LDL en circulación, y/o para aumentar la relación HDL/LDL en un individuo que lo necesita.

Los compuestos descritos se pueden usar en un método para disminuir los niveles de triglicéridos en circulación.

25 Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas preparadas para su almacenamiento o su administración. Dicha composición comprende normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, en la forma adecuada, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, y las características físicas del mamífero específico en consideración. Estos factores y su vinculación para determinar esta cantidad son bien conocidos de los profesionales sanitarios. Esta cantidad y el método de administración se pueden personalizar para conseguir una eficacia óptima, y puede depender de factores tales como el peso, dieta, medicación concurrente y otros factores, bien conocidos por los expertos en medicina. Las dosificaciones y posologías más adecuadas para uso humano pueden estar guiadas por los resultados obtenidos mediante la presente invención, y se pueden confirmar en ensayos clínicos correctamente diseñados. Los compuestos de la presente invención pueden ser especialmente útiles para el tratamiento de seres humanos.

40 Una dosificación eficaz y un protocolo de tratamiento se pueden determinar por medios convencionales, partiendo de una dosis baja en animales de laboratorio y posteriormente aumentando la dosis vigilando los efectos, y también variando sistemáticamente los regímenes de tratamiento. El profesional sanitario debe tener en cuenta numerosos factores cuando determine una dosificación óptima para un sujeto dado. Dichas consideraciones son bien conocidas del experto en la materia.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera de los vehículos farmacéuticos habituales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, suero salino estéril y suero salino tamponado con fosfato a pH fisiológico o ligeramente ácido pueden ser de utilidad. Los agentes reguladores del pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato de amonio, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina, o acetato o mezclas de los mismos. La expresión abarca además cualesquiera agentes relacionados en la farmacopea estadounidense para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

55 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de uno cualquiera de los compuestos de la invención. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Los ejemplos de sales básicas incluyen sales donde el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio, e iones amonio $^+N(R^3)3(R^4)$, donde R^3 y R^4 designan independientemente alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alqueno C_{2-6} opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE. UU., 1985 y ediciones más recientes, y en la Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

65 "Tratamiento" es un abordaje para obtener resultados beneficiosos o deseados, Para los fines de la presente

invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque no de forma limitativa, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, patología estabilizada (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología, y remisión (tanto total o parcial), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o de alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en determinadas realizaciones. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno se puede prevenir. Por tratamiento se entiende inhibir o reducir un aumento en la patología o en los síntomas (por ejemplo, aumento de peso, hiperglucemia) cuando se compara con la ausencia de tratamiento, y no implica necesariamente el cese completo de la dolencia en cuestión.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica unitaria. En dicha forma, la composición se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma farmacéutica unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, y polvos envasados en viales o ampollas. La forma farmacéutica unitaria también puede ser una cápsula, sello, o el propio comprimido, o puede ser el número adecuado de cualquiera de estas formas envasadas. Se puede proporcionar en una monodosis inyectable, por ejemplo, en la forma de una pluma. En ciertas realizaciones, las formas envasadas incluyen una etiqueta o prospecto con instrucciones para el uso. Las composiciones se pueden formular para cualquier vía y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, y transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Los modos de administración subcutáneos o transdérmicos pueden ser especialmente adecuados para los compuestos descritos en el presente documento.

Las composiciones de la invención pueden estar adicionalmente compuestas de, o unidas a, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo de fármacos, sistema de administración de fármacos y sistema de administración de fármacos avanzado para mejorar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir cronoterapia, como bien saben los expertos en la materia, y aumentar el cumplimiento terapéutico del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, aunque no de forma limitativa, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico, y copolímeros en bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas vehículoas, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, geles termogelificantes, por ejemplo sistemas copoliméricos en bloques bien conocidos de los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos de los expertos en la técnica del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrina y derivados de los mismos, y dendrímeros.

Terapia de combinación

Un compuesto o composición de la invención puede administrarse como parte de un tratamiento combinado con un agente para el tratamiento de la obesidad, hipertensión, dislipidemia o diabetes.

En tales casos, los dos principios activos pueden administrarse solos o por separado, y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

De esta forma, un compuesto o composición de la invención se puede usar adicionalmente junto con un agente antiobesidad, incluidos, aunque no de forma limitativa, un agonista del receptor de GLP-1 (péptido 1 análogo a glucagón) (por ejemplo, como se describe más adelante), un péptido YY o análogo del mismo, un neuropéptido Y (NPY) o un análogo del mismo, un antagonista del receptor 1 cannabinoide, un inhibidor de la lipasa, un péptido proset humano (HIP), el agonista 4 del receptor de la melanocortina, un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación del inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y un antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona), Orlistat™, Sibutramine™, CCK, amilina, pramlintida y leptina, así como análogos de los mismos o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

Un compuesto o composición de la invención se puede usar junto con un agente antihipertensivo, incluidos, aunque no de forma limitativa, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un bloqueante del receptor de la angiotensina II, diuréticos, betabloqueante, o un bloqueante de los canales de calcio.

Un compuesto o composición de la invención se puede usar junto con un agente dislipidémico, incluidos, aunque no de

forma limitativa, una estatina, un fibrato, una niacina, un inhibidor de PSCK9 (Proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9) y/o un inhibidor de la absorción del colesterol.

Adicionalmente, un compuesto o composición de la invención se puede usar junto con un agente antidiabético, incluidos, aunque no de forma limitativa, una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista del receptor de GLP-1 (que es diferente de los compuestos de la invención), un inhibidor de SGLT2 (es decir, un inhibidor del transporte de sodio-glucosa, por ejemplo, una glifozina tal como empaglifozina, canagliflozina, dapagliflozina o ipragliflozina), un agonista de GPR40 (un agonista de FFAR1/FFA1, por ejemplo, fasiglifam), o una insulina o un análogo de insulina.

Los ejemplos de agonistas del receptor de GLP-1 incluyen análogos de GLP-1 y GLP-1, exendina-4 y análogos de exendinana-4, liraglutida (Saxenda™, Victoza™), exenatida (Byetta™ y Bydureon™), Byetta LAR™, lixisenatida (Lyxumia™), Dulaglutida y Albiglutida.

Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, aunque no de forma limitativa, Lantus™, Novorapid™, Humalog™, Novomix™, Actraphane™ HM, Levemir™ Degludec™ y Apidra™.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis general de análogos del glucagón

Se llevó a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) sobre un sintetizador asistido por microondas usando una estrategia Fmoc convencional en NMP sobre una resina de poliestireno (TentaGel S Ram). Se usó HATU como reactivo de acoplamiento junto con DIPEA como base. Se usó piperidina (20 % en NMP) para desprotección. Pseudoprolinas: Se usó Fmoc-Phe-Thr(ψMe, Mepro)-OH (adquirida de NovaBiochem) según aplicabilidad.

Las abreviaturas utilizadas son las siguientes:

Boc:	terc-butiloxicaarbonilo
ivDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)3-metilbutilo
Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-etilo
DCM:	diclorometano
DMF:	N,N-dimetilformamida
DIPEA:	diisopropiletilamina
EDT:	1,2-etanoditiol
EtOH:	etanol
Et ₂ O:	éter dietílico
HATU:	N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridina-1-ilmetil]-N-metilmetanaminio
MeCN:	acetonitrilo
NMP:	N-metilpirrolidona
TFA:	ácido trifluoroacético
TIS:	triisopropilsilano

Escisión:

El péptido bruto se escindió de la resina por tratamiento con el 95/2,5/2,5 % (v/v) TFA/TIS/agua a temperatura ambiente (t.a.) durante 2 horas. La mayoría del TFA se eliminó a presión reducida y el péptido bruto se precipitó y se lavó con éter dietílico y se dejó secar hasta peso constante a temperatura ambiente.

Compuesto 1:

H-H-Aib-QGFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

Semaglutida y Liraglutida se usaron como compuestos de referencia.

Ejemplo 2: Ensayos de eficacia del receptor de glucagón y receptor de GLP-1

El ADNc que codifica bien el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) (número de registro primario P47871) o el receptor del péptido 1 análogo a glucagón (GLP-1 R) (número de registro primario P43220) se sintetizaron y se clonaron en un vector de expresión mamífero que contenía un marcador de resistencia a zeocina.

Los vectores de expresión mamíferos que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron a células de ovario de hámster chino (CHO) por el método Attractene. Se obtuvieron clones expresados de forma estable por selección de zeocina (250 µg/ml) tras dilución limitada de las células resistentes a la presión de selección. Las células que

expresaban los clones de Glucagón-R y GLP-1-R se replicaron, se propagaron y se sometieron a ensayo en ensayos de eficacia para Glucagón-R y GLP-1-R como se describe más adelante. Un clon que expresaba Glucagón-R y un clon que expresaba GLP-1-R se seleccionaron para el perfilado del compuesto.

- 5 Células CHO que expresaban el Glucagón-R humano, o el GLP-1-R humano se sembraron 24 horas antes del ensayo a 5000 células por pocillo en placas de microtitulación de 384 pocillos en cultivo en 50 µl de medio de cultivo. En el día del análisis, el medio de cultivo se retiró, y las células se lavaron una vez con 100 µl de tampón de ensayo (tampón Krebs-Ringer, KRBH). El tampón se retiró, y las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en 10 µl de KRBH (KRBH + HEPES 10 mM, NaHCO₃ 5 mM, BSA al 0,1 % (v/v)) con IBMX 0,1 mM en agua desionizada que contenía concentraciones crecientes de péptidos de ensayo. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de lisis (BSA al 0,1 % (p/v), HEPES 5 mM, Tween 20 al 0,3 % v/v). Tras lisar las células durante 10 min a temperatura ambiente, se añadieron 10 µl de mezcla aceptor/donante según contenido del kit de ensayo de AMPc funcional AlphaScreen™. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, el contenido de AMPc se determinó aplicando el kit de ensayo de AMPc funcional AlphaScreen™ de Perkin-Elmer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de la CE₅₀ y de eficacia relativa en comparación con los compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se calcularon aplicando ajuste de la curva realizado por medios informáticos. La relación GLP-1/glucagón se calculó como se ha definido antes. Véase la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	CE ₅₀ hGCGR CHO-K1 [nM]	CE ₅₀ hGLP-1R CHO-K1 [nM]	Relación GLP-1/Glucagón
1	3,6 nM	0,48 nM	0,13

Ejemplo 3: Actividad agonista del receptor de GLP-1 endógeno

La actividad agonista de los compuestos de ensayo sobre los receptores de tipo GLP-1 endógenos se determinó una línea de células de insulinoma de murino. El AMPc intracelular se usó como un indicador de la activación del receptor.

Las células se cultivaron durante 24 h a una densidad de 10.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos. El medio se retiró y 10 µl de tampón KRBH (NaCl 130 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM) que contenía el compuesto de ensayo o GLP-1 (a concentraciones crecientes desde 0,1 pM a 100 nM) o control con disolvente (DMSO al 0,1 % (v/v)) se añadieron a los pocillos durante 15 minutos a una temperatura de 26 °C.

El contenido de AMPc se midió con el kit de ensayo de AMPc funcional AlphaScreen™ (Perkin Elmer). La medición se realizó usando Envision (PerkinElmer) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los resultados se convirtieron a concentraciones de AMPc usando una curva patrón de AMPc preparada en tampón KRBH que contenía DMSO al 0,1 % (v/v). Las curvas de AMPc resultantes se representaron gráficamente como concentraciones absolutas de AMPc (nM) frente a log(concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

Se calculó la CE₅₀ como la concentración de compuesto de ensayo que da como resultado una elevación semimáxima de los niveles de AMPc, que refleja la potencia del compuesto de ensayo. Véase la Tabla 2.

Tabla 2.

Compuesto	CE ₅₀ [nM]
1	0,54 nM

Ejemplo 4: Actividad agonista del receptor de glucagón endógeno

La actividad agonista de los compuestos de ensayo sobre el receptor de glucagón endógeno se determinó midiendo su efecto sobre la velocidad de la síntesis de glucógeno en hepatocitos primarios de rata. Tras la activación del receptor de glucagón, se espera una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno. La velocidad de síntesis de glucógeno se determinó contando la cantidad de glucosa radiomarcada incorporada a los almacenes de glucógeno celular en un periodo de tiempo definido.

Los hepatocitos primarios de rata se cultivaron a una densidad de 40.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

El medio se descartó y las células se lavaron con PBS. 180 µl de tampón basado en KRBH que contenía BSA al 0,1 % y glucosa a una concentración de 22,5 mM se añadió a continuación a los pocillos, seguido por los compuestos de ensayo y D-[U-¹⁴C] glucosa 40 µCi/ml (20 µl de cada uno). La incubación se continuó durante 3 horas.

Al final del periodo de incubación, el tampón de incubación se aspiró, y las células se lavaron una vez con PBS enfriado sobre hielo antes de la lisis por incubación durante 30 min a temperatura ambiente con 100 µl de NaOH 1 mol/l.

Los lisados celulares se transfirieron a placas de filtro de 96 pocillos y el glucógeno precipitó mediante incubación de las placas de filtro durante 120 min a 4 °C seguido por lavado de las placas de filtro 4 veces con etanol enfriado en hielo (70 %). Los precipitados resultantes se filtraron a sequedad y la cantidad de ¹⁴C-glucosa incorporada se determinó usando un contador de centelleo de sobremesa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los pocillos con controles de vehículo DMSO (0,1 % (v/v) en tampón KRBH) se incluyeron como referencia para la síntesis de glucógeno no inhibida (100 % de CTL). Los pocillos sin D-[U¹⁴C] glucosa añadida se incluyeron como controles de señal de fondo no específica (se resta de todos los valores). El péptido glucagón endógeno se usó como control positivo.

Todos los tratamientos se realizaron al menos por duplicado.

Los parámetros calculados para describir tanto la potencia como la actividad agonista de cada compuesto de ensayo sobre el receptor de glucagón endógeno son pCE₅₀ y % de CTL.

% de CTL se determina calculando el porcentaje de CPM/pocillo en presencia del compuesto de ensayo en comparación con el CPM/pocillo del control con vehículo tras restar el CPM/pocillo de fondo;

$$[\text{CPM/pocillo (inicial)} - \text{CPM/pocillo (muestra)}] * 100 / [\text{CPM/pocillo (inicial)} - \text{CPM/pocillo (control)}]$$

Un activador del receptor de glucagón daría como resultado una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno y proporcionará valores de % de CTL comprendidos entre 0 % de CTL (inhibición completa) y 100 % de CTL (sin inhibición observable).

Las curvas de actividad resultantes se representaron gráficamente como cuentas absolutas (unidad: cpm/muestra) frente a log(concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

CE₅₀ se calculó como medida de la potencia del compuesto de ensayo y se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Compuesto	CE ₅₀ [nM]
1	5,6 nM

Los términos CE₅₀ y pCE citados con respecto a la activación de GLP-1 R también se pueden considerar como CI₅₀ y pCI₅₀ con respecto a la síntesis de glucógeno.

Ejemplo 5: Estimación de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de ensayo se determinaron después de la administración intravenosa a ratas Han/Wistar. El análogo de GLP-1 acilado, semaglutida, también se estudió con fines comparativos.

Las ratas Wistar macho se obtuvieron de Charles River (Alemania) y pesaban aproximadamente de 180 a 210 g en el momento de su llegada a la instalación experimental. Las ratas se enjaularon en jaulas normalizadas europeas para ratas de tipo IV con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Durante el estudio, las ratas se alojaron en jaulas normalizadas para ratas de tipo III. Tanto el pienso Altromin 1324 (Altromin, Alemania) como el agua se administraron a voluntad durante la totalidad del periodo experimental. Los animales se alojaron en la instalación experimental durante al menos 4 días para garantizar una aclimatación correcta.

Los compuestos se disolvieron en primer lugar en una solución acuosa de amoníaco al 0,1 % hasta una concentración nominal de 2 mg/ml, y después se diluyó hasta la concentración de dosificación deseada (10 mM) en PBS estéril que contenía tampón fosfato 25 mM, pH 7,4. Se administraron inyecciones intravenosas correspondientes a 20 nmol/kg mediante una vena de la cola lateral.

Se recogieron muestras de sangre (200 µl) del plexo periorbital en los puntos temporales 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 y 48 h después de la dosificación en tubos K₃EDTA y se centrifugaron durante 5 minutos a 4 °C a los 20 minutos de tomar la muestra. Las muestras de plasma (>100 µl) se transfirieron a placas PCR de 96 pocillos, se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar la concentración plasmática del correspondiente compuesto GLP-1-glucagón usando LC-MS/MS. Los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un enfoque no compartimental usando ToxKin™ versión 3.2 (Unilog IT Services), y se determinaron los parámetros farmacocinéticos resultantes. Véase la Tabla 4.

Tabla 4.

Compuesto	Aclaramiento (ml/min/kg)	Semivida terminal (h)	Tiempo de residencia medio (h)
1	0,09	15,2	19,2
Semaglutida	0,10	9,0	11,4

Ejemplo 6: Ensayo de tolerancia a la glucosa oral

- 5 Los efectos de los compuestos de ensayo sobre el control glucémico se determinaron mediante un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en ratones C57BL6/J macho de 7-8 semanas de edad (obtenidos de Charles River Laboratories, Alemania). Los animales se alojaron en grupos en jaulas individualmente ventiladas (línea verde de Tecniplast) con un ciclo de luz de 12 horas. Tuvieron acceso a voluntad a un pienso de roedores convencional (Provimi Kliba 3438) y agua. Los animales se alojaron en la instalación experimental durante al menos una semana antes del OGTT. Todos los protocolos experimentales relativos al uso de animales de laboratorio fueron revisados por un Comité
- 10 ético federal y fueron autorizados por las autoridades gubernamentales.

- Los compuestos se disolvieron en primer lugar en una solución acuosa de amoníaco al 0,1 % hasta una concentración nominal de 2 mg/ml, y posteriormente se diluyeron hasta la concentración de dosificación deseada en PBS estéril que
- 15 contenía tampón fosfato 25 mM, pH 7,4. Los compuestos se administraron por la mañana mediante inyección subcutánea a una dosis de 30 nmol/kg y un volumen de 5 ml/kg. Los animales del control recibieron solamente una inyección con vehículo. El análogo de GLP-1 liraglutida se ensayó con fines comparativos. El tamaño de grupo fue 5 animales por grupo.

- 20 El OGTT se realizó 24 h o 48 h después de la administración del compuesto. Los animales ayunaron durante 10 h antes del OGTT pero siguieron teniendo acceso a voluntad al agua. Tras el ayuno nocturno, se obtuvo una muestra de sangre intolerancia a la glucosa (0 min) mediante sangrado de la cola y la glucosa en sangre se midió con un glucómetro. A continuación, los animales se estimularon con una carga de glucosa oral (2 g/kg) dada como solución por sonda nasogástrica (5 ml/kg). Las muestras de sangre adicionales para la medición de glucosa se obtuvieron
- 25 mediante sangrado de la cola en puntos temporales después de la carga de glucosa (15, 30, 60, 90, y 120 min).

- Las desviaciones de glucosa se cuantificaron calculando el área total bajo la curva de glucosa en sangre-tiempo (ABC= entre 0 min y 120 min. El cálculo de la ABC se realizó por la regla del trapecio sin corrección de la línea base. Los datos se expresaron como media % del control (% de CTL). Un valor de 100 % de CTL indica que no hay efecto
- 30 observable, y valores estadísticamente significativos por debajo de 100 % de CTL muestran una mejora en la tolerancia a la glucosa. Véase la Tabla 5.

Tabla 5.

	OGTT ABC 30 nmol/kg [% de CTL]	
	24 h	48 h
Compuesto 1	56	74
Liraglutida	73	

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Zealand Pharma A/S
Boehringer Ingelheim International GmbH
- 40 <120> Análogo de glucagón acilado
- <130> GRF/FP7192412
- 45 <150> EP 15163903.6
<151> 16/4/2015
- <160> 5
- 50 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 29

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Compuesto sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 10 <223> Aib

 <220>
 <221> SITE
 <222> (28)..(28)
 15 <223> Lys([17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)
 <400> 1

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

 Arg Ala Ala Lys Asp Phe Ile Glu Trp Leu Glu Lys Ala
 20 25
 20
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Separador haxapeptídico sintético

 <400> 2
 30
 Gly Ser Gly Ser Gly Gly
 1 5

 <210> 3
 <211> 29
 35 <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
 40
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 1 5
 50
 <210> 5
 <211> 37

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

5

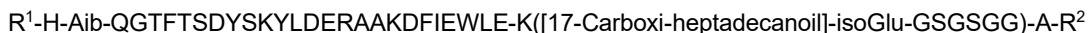
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



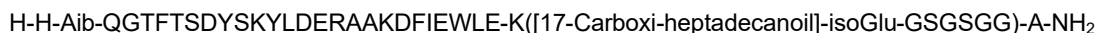
en la que

R^1 es H (hidrógeno), alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo y

R^2 es OH o NH_2 ;

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

3. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en premezcla con un vehículo.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la composición es una composición farmacéutica y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en un método de tratamiento médico.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en un método para prevenir el aumento de peso o fomentar la pérdida de peso en un individuo que lo necesita.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en un método para disminuir los niveles de LDL en circulación, y/o para aumentar la relación HDL/LDL en un individuo que lo necesita.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en un método de tratamiento de una dolencia producida o caracterizada por un exceso de peso corporal.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en un método para mejorar el control glucémico o la prevención o el tratamiento de la obesidad, obesidad mórbida, obesidad mórbida anterior a cirugía, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vejiga biliar relacionada con obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, diabetes, síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular.

10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 en donde la diabetes es diabetes de tipo 2.

11. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 en donde el compuesto se administra como parte de una terapia de combinación junto con un agente para el tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia o hipertensión.

12. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que:

(i) el agente para el tratamiento de la diabetes es una biguanida, una sulfonilurea, una meglitinida o glinida, un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista del receptor de GLP-1, un inhibidor de SGLT2, un agonista de GPR40, o una insulina o un análogo de insulina;

(ii) el agente para el tratamiento de la obesidad es un agonista del receptor de GLP-1, un péptido YY o un análogo del mismo, un neuropéptido Y (NPY) o un análogo del mismo, un antagonista del receptor 1 cannabinoideo, un inhibidor de la lipasa, un péptido prolslet humano (HIP), el agonista 4 del receptor de la melanocortina, un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación del inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y un antagonista del receptor opioideo, OrlistatTM, SibutramineTM, CCK, amilina, pramlintida y leptina y análogos de los mismos, o un agente serotoninérgico;

(iii) el agente para el tratamiento de la hipertensión es un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un bloqueante del receptor de la angiotensina II, un diurético, un betabloqueante o un bloqueante de los canales de calcio; o

(iv) el agente para el tratamiento de la dislipidemia es una estatina, un fibrato, una niacina, un inhibidor de PCSK9 (proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9) y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.

13. Un kit terapéutico que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4.

5 14. Un método de síntesis de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 por medio de síntesis de péptido en fase sólida o en fase líquida.

10 15. Un método para producir un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, comprendiendo el método expresar una secuencia peptídica precursora a partir de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido precursor, recuperar el producto de expresión y modificar el péptido precursor para dar como resultado un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.