

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 496**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10851547 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2571897**

54 Título: **Nuevos análogos de péptido similar a glucagón, composición, y métodos de uso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2015

73 Titular/es:

**BETTA PHARMACEUTICALS CO., LTD. (100.0%)
589 Hongfeng Rd., Yuhang
Hangzhou, Zhejiang 311100 , CN**

72 Inventor/es:

**HU, SHAOJING;
TAN, FENLAI;
WANG, YANPING;
MA, CUNBO;
HU, YUNYAN;
CAO, HONG;
ZHAO, XIANGDONG;
LONG, WEI;
WANG, YINXIANG y
DING, LIEMING**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 528 496 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

Nuevos análogos de péptido similar a glucagón, composición, y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos novedosos del péptido similar a glucagón y composiciones que son útiles para aumentar la expresión de insulina en mamíferos y para el tratamiento de la diabetes. En particular, estos derivados peptídicos proporcionan larga duración de acción para el tratamiento de diabetes y otras enfermedades relacionadas con péptidos insulínotropicos, función gastrointestinal y actividades asociadas con los niveles de glucagón.

Antecedentes de la invención

La secreción endocrina de los islotes pancreáticos está regulada por un mecanismo de control complejo dirigido no solo por metabolitos transportados por la sangre tales como glucosa, aminoácidos y catecolaminas, sino también por influencia paracrina local. Las principales hormonas de los islotes pancreáticos, glucagón, insulina y somatostatina, interaccionan con tipos celulares pancreáticos específicos (células A, B y D, respectivamente) para modular la respuesta secretora. Aunque la secreción de insulina está predominantemente controlada por los niveles de glucosa en sangre, la somatostatina inhibe la secreción de insulina mediada por glucosa. Además de la regulación paracrina entre islotes de la secreción de insulina, hay evidencia para apoyar la existencia de factores insulínotropicos en el intestino. Este concepto de incretina se origina de la observación de que la ingesta de alimentos o administración entérica de glucosa provocaba una mayor estimulación de la liberación de insulina comparada con una cantidad similar de energía (glucosa) infundida por vía intravenosa (Elrick, H., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24, 1076-1082, 1964; McIntyre, N., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25, 1317-1324, 1965). Por tanto, se postuló que las señales derivadas del intestino estimuladas por la ingestión oral de nutrientes representan potentes secretagogos de insulina responsables para el aumento de la liberación de insulina cuando se administra energía a través del intestino frente a la ruta parenteral (Dupre, J., et al., *Diabetes*, 15, 555-559, 1966). Aunque varios neurotransmisores y hormonas intestinales poseen actividad de tipo incretina, la considerable evidencia de estudios de inmunización, antagonistas y desactivación génica sugieren que el polipéptido insulínotropico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido similar a glucagón (GLP)-1 representan los péptidos dominantes responsables para la mayor parte de la secreción de insulina estimulada por nutrientes. La observación de que pacientes con diabetes de tipo 2 muestran una reducción significativa en la magnitud de la liberación secreción de insulina estimulada por comida subraya el interés en determinar si la liberación deficiente de incretinas o la resistencia a la acción de incretinas contribuye a la patofisiología de la disfunción de células β en sujetos diabéticos.

El péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) se identificó primero en 1987 como una hormona incretina, un péptido secretado por el intestino tras la ingesta de alimentos. GLP1 se secreta por las células L del intestino después de ser proteolíticamente procesado de la proteína precursora de 160 aminoácidos, proglucagón. El corte del proglucagón primero da GLP-1, un péptido de 37 aminoácidos, GLP-1(1-37)OH, que es poco activo. Un corte posterior en la posición 7 da el GLP-1(7-37)OH biológicamente activo. Aproximadamente el 80% del GLP-1(7-37)OH que se sintetiza está amidado en el C-terminal después de la eliminación del residuo de glicina terminal en la célula L. Los efectos biológicos y el recambio metabólico del GLP-1(7-37)OH ácido libre y la amida, GLP-1(7-37)NH₂, son indistinguibles.

Se sabe que GLP-1 estimula la secreción de insulina lo que produce la absorción de glucosa por células lo que disminuye los niveles de glucosa en suero (Mojsos, S., et al., *J. Clin. Invest.*, 79, 616-619, 1987; Kreymann, B., et al., *Lancet* ii, 1300-1304, 1987; Orskov, C., et al., *Endocrinology*, 123, 2009-2013, 1988). La inyección intracerebroventricular aguda de GLP-1 o agonistas del receptor de GLP-1 produce reducción transitoria en la ingesta de alimentos (Turton M.D., et al., *Nature*, 379, 60-72, 1996), mientras que la administración de agonistas del receptor de GLP-1 intracerebroventricular o parenteral más prolongada se asocia con pérdida de peso en algunos estudios (Meeran, K., et al., *Endocrinology*, 140, 244-250, 1999; Davies, H.R. Jr., *Obes. Res.*, 6, 147-156, 1998; Szayna, M., et al., *Endocrinology*, 141, 1936-1941, 2000; Larsen, P.J., et al., *Diabetes*, 50, 2530-2539, 2001). En la técnica se conocen números análogos de GLP-1 que demuestran acción insulínotropica. Estos análogos incluyen, por ejemplo, GLP-1(7-36), Gln⁹-GLP-1(7-37), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), aceti-Lys⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37) y Lys¹⁸-GLP-1(7-37). Los derivados de GLP-1 incluyen, por ejemplo, sales de adición ácida, sales carboxilato, ésteres de alquilo inferior, y amidas (documentos WO91/11457; EP0733644; patente en EE UU 5512549).

La mayor parte de la acción de GLP-1 delineada en experimentos preclínicos también se ha demostrado en estudios en seres humanos. La infusión de GLP-1(7-36)NH₂ en sujetos humanos normales estimuló la secreción de insulina, redujo significativamente la glucosa en sangre en estado de ayuno después de carga de glucosa o ingesta de alimentos (Orskov, C., et al., *Diabetes*, 42, 658-661, 1993; Qualmann, C., et al., *Acta Diabetol.*, 32, 13-16, 1995).

Los péptidos basados en GLP-1 tienen una gran promesa como alternativas a la terapia de insulina para pacientes con diabetes que han fracasado en el tratamiento con sulfonilureas (Hauck, M.A.; et al., *Diabetes Care*, 21 1925-1931, 1998). GLP-1 estimula la secreción de insulina, pero solo durante el periodo de hiperglucemia. La seguridad

de GLP-1 comparada con insulina aumenta por esta propiedad de GLP-1 y por la observación de que la cantidad de insulina secretada es proporcional a la magnitud de la hiperglucemia. Además, la terapia de GLP-1 producirá la liberación pancreática de insulina y acción de insulina de primer paso en el hígado. Esto produce niveles circulantes de insulina menores en la periferia comparado con las inyecciones subcutáneas de insulina. GLP-1 ralentiza el vaciado gástrico que es deseable en que extiende la absorción de nutrientes durante un periodo de tiempo más largo, lo que disminuye el pico de glucosa postprandial. Varios artículos pueden sugerir que GLP-1 puede aumentar la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos tales como músculo, hígado, y grasa. Por último, se ha mostrado que GLP-1 es un potencial regulador del apetito.

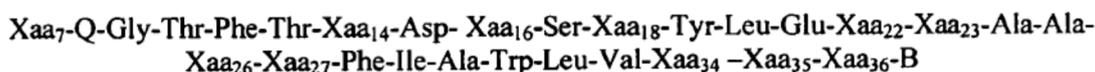
El potencial terapéutico para GLP-1 y sus análogos aumenta más si se considera su uso en pacientes con diabetes de tipo 1. Un número de estudios ha demostrado la eficacia de GLP-1 nativo en el tratamiento de diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI). De forma similar a los pacientes de diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI), GLP-1 es eficaz en reducir la hiperglucemia en ayunas mediante sus propiedades glucagonostáticas. Estudios adicionales han indicado que GLP-1 también reduce la excursión glucémica postprandial en DMNDI, lo más probablemente mediante un retraso en el vaciado gástrico. Estas observaciones sugieren que GLP-1 puede ser útil como un tratamiento para DMDI así como para DMNDI.

Sin embargo, la semivida biológica de las moléculas de GLP-1 nativo que se realiza mediante la actividad de dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV) es bastante corta. Por ejemplo, la semivida biológica de GLP-1(7-37)OH es unos meros 3 a 5 minutos (patente en EE UU 5118666). La disminución sostenida de la concentración de glucosa en sangre solo se observa con infusión continua, como se demuestra en estudios en los que GLP-1 se administró por infusión intravenosa a la largo de una evolución temporal de 24 horas (Larsen, J.; et al. *Diabetes Care*, **24**, 1416-1421, 2001). Se ha mostrado que la enzima DPP IV, una serina proteasa que preferentemente hidroliza péptidos después de una penúltima prolina (Xaa-Pro-) o alanina (Xaa-Ala-) NH₂-terminal (Mentlein, R., *Regul. Pept.*, **85**, 9-25, 1999), metaboliza rápidamente GLP-1 in vitro. Por tanto, péptidos basados en GLP-1 de duración extendida que son resistentes a DPP IV pueden tener gran potencial terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona análogos de GLP-1 novedosos que tienen acción extendida en el tiempo relativa a GLP-1 nativo y son completamente resistentes a hidrólisis por DDP IV.

La invención incluye compuestos de la fórmula general I:

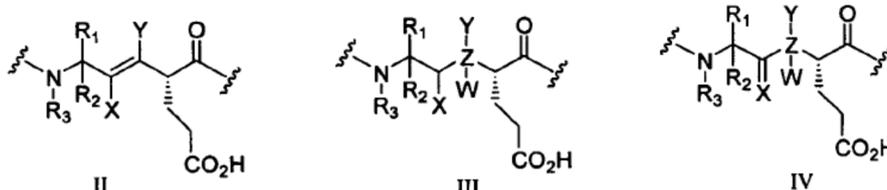


I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, y a-metil-histidina;

Q se selecciona de los siguientes enlazadores:



en donde:

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,

X es hidrógeno, flúor, hidroxilo, trifluorometilo, oxígeno,

Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, alquilo de (C₁-C₆),

Z es nitrógeno, carbono, oxígeno, azufre,

Cuando Z es nitrógeno, oxígeno, azufre, W no existe. Cuando Z es carbono, W es hidrógeno, flúor.

Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

5 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₁₆ es lisina unida con T-U.

10 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₁₆ es lisina unida con T-U.

15 Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

20 Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

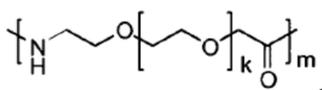
25 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y Xaa₃₆ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₂₆ es lisina unida con T-U.

30 B se selecciona del grupo que consiste en glicina, NH₂ y OH que representa la forma amida o ácido libre del aminoácido terminal o cuando Xaa₂₆ es aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico) y sin unir con T-U, B preferiblemente se selecciona de segmentos peptídicos que consisten en de dos a cinco aminoácidos naturales o no naturales y un aminoácido debe ser cisteína, ejemplos pero no limitados como cisteína-serina-glicina o cisteína-alanina, y monometoxipolietilenglicol maleimida está unida a cisteína.

T se selecciona del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico y HOOC(CH₂)_nCOOH;

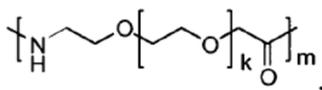
35 n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27;

o T se selecciona del grupo que consiste en



40 y en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

45 U solo existe cuando T es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico; o cuando T se selecciona del grupo que consiste en

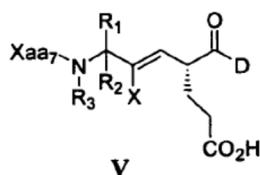


50 y en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

U es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos.

55 Aún otro compuesto preferido como muestra la fórmula V:

Aún otro compuesto preferido como muestra la fórmula V



En donde

- 5 R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 X es hidrógeno, flúor, hidroxilo, trifluorometilo, oxígeno,

10 D es Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B

Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, y a-metil-histidina;

15 Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

20 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₁₆ es lisina unida con T-U.

25 Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

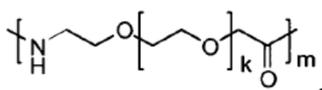
30 Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

35 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₃, Xaa₃₄, y Xaa₃₅ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₂₆ es lisina unida con T-U.

40 B se selecciona del grupo que consiste en glicina, NH₂ y OH que representa la forma amida del ácido libre del aminoácido terminal. Cuando Xaa₂₆ es aminoácidos naturales o naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico) y sin unir con T-U, B preferiblemente se selecciona de segmentos peptídicos que consisten en de dos a cinco aminoácidos naturales o no naturales y un aminoácido debe ser cisteína, ejemplos pero no limitados como cisteína-serina-glicina o cisteína-alanina, y monometoxipolietilenglicol maleimida está unida a cisteína.

45 T se selecciona del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico y HOOC(CH₂)_nCOOH;
 n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27;

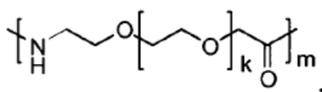
o T se selecciona del grupo que consiste en



50 en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U solo existe cuando T es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico; o cuando T se selecciona del grupo que consiste en

55



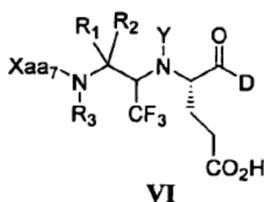
en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

5 U es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 X es hidrógeno, flúor, trifluorometilo.

10 O R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno o metilo, o cuando R₁ es metilo, R₂ y R₃ es hidrógeno; o cuando R₁ y R₃ es hidrógeno y R₂ es metilo, o R₃ forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ y R₂ es hidrógeno, o R₃ forma un anillo de 5-8 miembros con R₂ y R₁ es hidrógeno.

15 Compuestos más preferidos como se muestran en la fórmula VI,



20 en donde

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, alquilo de (C₁-C₆),

25 D es Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B

30 Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, y a-metil-histidina;

35 Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

40 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₁₆ es lisina unida con T-U.

45 Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

50 Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

55 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₂₆ es lisina unida con T-U.

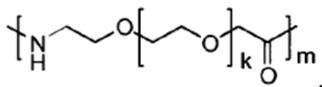
B se selecciona del grupo que consiste en glicina, NH₂ y OH que representa la forma amida del ácido libre del aminoácido terminal. Cuando Xaa₂₆ es aminoácidos naturales o naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico) y sin unir con T-U, B preferiblemente se selecciona de segmentos peptídicos que consisten en de dos a cinco aminoácidos naturales o no naturales y un

aminoácido debe ser cisteína, ejemplos pero no limitados como cisteína-serina-glicina o cisteína-alanina, y monometoxipolietilenglicol maleimida está unida a cisteína.

T se selecciona del grupo que consiste en ácido γ -glutámico, β -alanina, ácido γ -aminobutírico y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$;

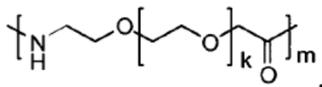
n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27;

o T se selecciona del grupo que consiste en



en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U solo existe cuando T es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido γ -glutámico, β -alanina, ácido γ -aminobutírico; o cuando T se selecciona del grupo que consiste en



en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos

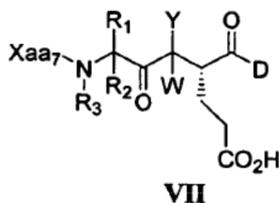
R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₃ es hidrógeno,

Y es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆).

Aún otros compuestos preferidos como se muestra en la fórmula VII



En donde

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),

R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,

Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, alquilo de (C₁-C₆),

W es hidrógeno, flúor.

D es Gly-Phe-Thr-Xaa₁₄-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Thr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-B

Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina, y α -metil-histidina;

Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₁₆ es lisina unida con T-U.

Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

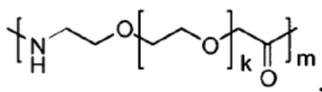
5 Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

10 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo. O Xaa₂₆ es lisina unida con T-U.

15 B se selecciona del grupo que consiste en glicina, NH₂ y OH que representa la forma amida del ácido libre del aminoácido terminal. Cuando Xaa₂₆ es aminoácidos naturales o naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico) y sin unir con T-U, B preferiblemente se selecciona de segmentos peptídicos que consisten en de dos a cinco aminoácidos naturales o no naturales y un aminoácido debe ser cisteína, ejemplos pero no limitados como cisteína-serina-glicina o cisteína-alanina, y monometoxipolietilenglicol maleimida está unida a cisteína.

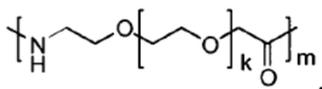
20 T se selecciona del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico y HOOC(CH₂)_nCOOH; n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27;

25 o T se selecciona del grupo que consiste en



30 en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U solo existe cuando T es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico; o cuando T se selecciona del grupo que consiste en

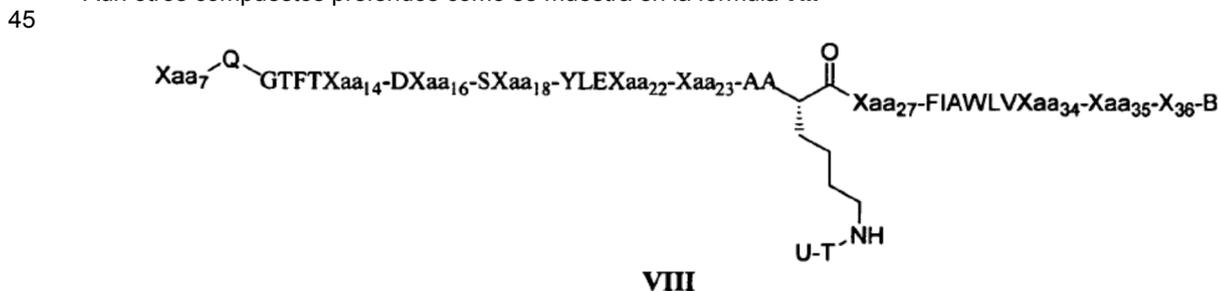


35 en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos

40 R₃ es hidrógeno, o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
Y es hidrógeno, flúor,
W es hidrógeno, flúor.

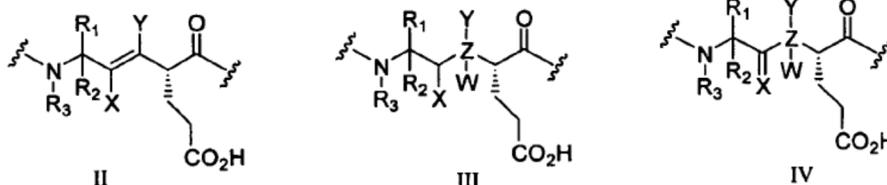
Aún otros compuestos preferidos como se muestra en la fórmula VIII



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

50 Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, y α-metil-histidina;

Q se selecciona de los siguientes enlazadores:



5 en donde:

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 X es hidrógeno, flúor, hidroxilo, trifluorometilo, oxígeno,
 Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, alquilo de (C₁-C₆),
 Z es nitrógeno, carbono, oxígeno, azufre,
 Cuando Z es nitrógeno, oxígeno, azufre, W no existe. Cuando Z es carbono, W es hidrógeno, flúor.

15 Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

20 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

25 Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

30 Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

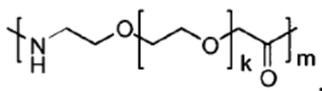
35 Xaa₂₇, Xaa₃₃, Xaa₃₄, y Xaa₃₅ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

40 B se selecciona del grupo que consiste en glicina-NH₂, NH₂ y OH que representa la forma amida del ácido libre del aminoácido terminal.

T se selecciona del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico y HOOC(CH₂)_nCOOH;

45 n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27;

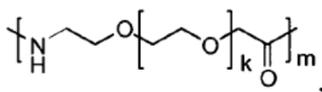
o T se selecciona del grupo que consiste en



45 en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

U solo existe cuando T es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico; o cuando T se selecciona del grupo que consiste en

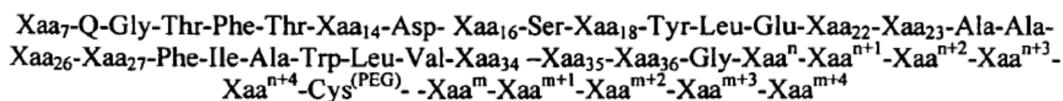
50



en donde k se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y m se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

55 U es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos;

Aún otros compuestos preferidos como se muestra en la fórmula IX

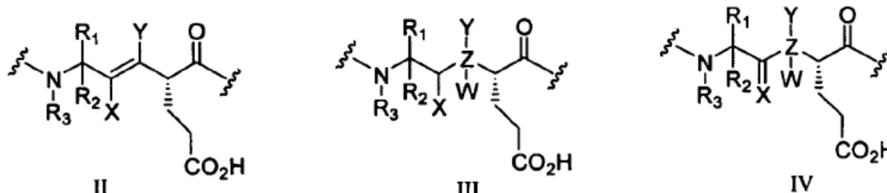


IX

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

Xaa₇ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, y α-metil-histidina;

10 Q se selecciona de los siguientes enlaces:



en donde:

- 15 R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 X es hidrógeno, flúor, hidroxilo, trifluorometilo, oxígeno,
 20 Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, alquilo de (C₁-C₆),
 Z es nitrógeno, carbono, oxígeno, azufre,
 Cuando Z es nitrógeno, oxígeno, azufre, W no existe. Cuando Z es carbono, W es hidrógeno, flúor.

25 Xaa₁₄ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, e histidina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con una o más grupos alquilo

30 Xaa₁₆ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en valina, lisina y leucina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

35 Xaa₁₈ es un aminoácido natural o no natural seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, y lisina; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, Aib y ácido glutámico; en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

40 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₃, Xaa₃₄, y Xaa₃₅ son aminoácidos naturales o no naturales seleccionados del grupo que consiste en glicina, lisina, arginina, leucina y asparragina, Aib (ácido α-aminoisobutírico); en donde uno o más de los átomos de carbono de dicho aminoácido está opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo.

45 Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, Xaaⁿ⁺⁴, Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, Xaa^{m+4} todos juntos podrían ser uno, o dos, o tres o cuatro aminoácidos seleccionados de aminoácidos naturales o no naturales. En otras palabras, Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, Xaaⁿ⁺⁴, Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, Xaa^{m+4} todos juntos con cisteína formarán segmentos de dos aminoácidos a cinco aminoácidos y la cisteína unida a monometoxipoliethylenglicol maleimida.

50 Se proporcionan los siguientes compuestos de la invención para dar al lector un entendimiento de los compuestos abarcados por la invención:

- [enlazador Q-d8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido
- [enlazador Q-a8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido

- [enlazador Q-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido
- [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido
- [enlazador Q-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido
- [enlazador Q-f8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- 5 • N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-e8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-f8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-a8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- 10 • N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-b8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[(N $^{\epsilon}$ - ω -carboxiheptadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- N- ϵ^{26} -[(N $^{\epsilon}$ - ω -carboxinonadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido
- [enlazador Q-d8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂
- [enlazador Q-c8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂
- 15 • [enlazador Q-a8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂
- [enlazador Q-b8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂
- [enlazador Q-e8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂
- [enlazador Q-f8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

20 Clave para la presente invención es sustituir el enlace amida de Ala⁸ del amino terminal de GLP-1, que es el sitio de reconocimiento para DPP-IV, con los enlazadores imitadores del enlace peptídico. Los enlazadores imitadores del enlace peptídico son un enfoque clásico en el descubrimiento de fármacos por imitar el enlace peptídico natural y que retiene la capacidad de interactuar con las dianas biológicas y producir los mismos efectos biológicos (*Curr Chem Bio*, **12**, 292-296, 2008). Basado en el mismo principio, los análogos de GLP-1 modificados por enlazadores imitadores del enlace peptídico deben retener la misma actividad biológica y tener larga duración de acción como agentes insulino-trópicos.

Los compuestos de la invención pueden tener uno o más centros asimétricos, tal como el enlazador A en la fórmula I. Tales compuestos pueden estar presentes en una o más formas estereoisoméricas. Estos compuestos pueden ser, por ejemplo, racematos, formas ópticamente activas, o mezclas enantioméricamente enriquecidas de estereoisómeros. Donde se desee, se pueden obtener los enantiómeros individuales, es decir, formas ópticamente activas, por procedimientos conocidos, por ejemplo, por síntesis asimétrica, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, o por resolución de los racematos. La resolución de los racematos se puede lograr por métodos convencionales tales como, por ejemplo, cristalización en presencia de un agente de resolución; derivación con un reactivo de resolución enantioméricamente puro o enriquecido seguido por aislamiento del isómero deseado; o cromatografía usando, por ejemplo, un columna de HPLC quiral.

El término "polipéptido" y "péptido" como se usa en el presente documento significa un compuesto formado de al menos cinco aminoácidos constituyentes unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no están codificados por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no están codificados por el código genético son, por ejemplo, ν -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden aminoácidos producidos por síntesis química, es decir, isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético tal como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tie (tert-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico.

Los 22 aminoácidos proteogénicos son:

50 Alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina.

Por tanto, un aminoácido no proteogénico es una fracción que se puede incorporar en un péptido a través de enlaces peptídicos pero no es un aminoácido proteogénico. Los ejemplos son γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, los D-aminoácidos tales como D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos no proteogénicos comprenden aminoácidos producidos mediante síntesis química, es decir, isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético tal como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tie (tert-butilglicina), ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico, desamino-histidina, los análogos β de aminoácidos tal como β -alanina etc. D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N ^{α} -acetil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-

piridilalanina, ácido (1-amino-ciclopropil)-carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)-carboxílico, ácido (1-aminociclopropil)-carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)-carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)-carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)-carboxílico.

5 La secuencia de aminoácidos para GLP ha sido descrita por varios investigadores (Lopez, L. C. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, USA 80, 5485-5489, 1983; Bell, G.I., et al., *Nature* 302:716- 718(1983); Heinrich, G., et al, *Endocrinol*, 115:2176-2181(1984). La estructura del ARNm del proglucagón y su correspondiente secuencia de aminoácidos se conoce bien. El procesamiento por proteólisis del producto génico precursor, proglucagón, en glucagones y los dos péptidos insulínotropicos, se ha caracterizado. Como se usa en el presente documento, la notación de GLP-1 (1-
10 37) se refiere a un polipéptido GLP-1 que tiene todos los aminoácidos desde el 1 (extremo N) hasta el 37 (extremo C). Similarmente, GLP-1 (7-37) se refiere a un polipéptido GLP-1 que tiene todos los aminoácidos desde el 7 (extremo N) hasta el 37 (extremo C). Similarmente, GLP-1 (7-36) se refiere a un polipéptido GLP-1 que tiene todos los aminoácidos desde el número 7 (extremo N) hasta el número 36 (extremo C).

15 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención en combinación con uno o más soportes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 El principio de la síntesis en fase sólida de polipéptidos se conoce bien en la técnica y se puede encontrar en textos generales en el área tales como Dugas, H. y Penney, C., *Bioorganic Chemistry* (1981) Springer-Verlag, Nueva York, páginas 54-92; Merrifield, J.M., *Chem. Soc.*, 85, 2149, 1962, y Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, páginas 24-66, Freeman (San Francisco, 1969).

25 Por ejemplo, se puede sintetizar un fragmento peptídico de la invención por metodología de fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430 (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404) y ciclos de síntesis suministrados por Applied Biosystems. Aminoácidos protegidos con Boc y otros reactivos están comercialmente disponibles de Applied Biosystems y otros vendedores químicos. Se aplica química secuencial de Boc usando protocolos de doble acoplamiento a las resinas de p-metil benzhidril amina de partida para la producción de carboxamidas C-terminales. Para la producción de ácidos C-terminales, se puede usar la correspondiente resina PAM. Asp, Gln y Arg se acolan usando ésteres de hidroxilbenzotriazol preformados.
30

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención que está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml hasta 25 mg/ml, y en donde dicha formulación tiene un pH de 3,0 a 9,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En una forma de realización de la invención la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es típicamente una solución o suspensión. En una forma de realización adicional de la invención la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende agua al menos al 50% p/p. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende agua al menos al 50% p/p, y el término "suspensión acuosa" se define como un suspensión que comprende agua al menos al 50% p/p.
35 40

45 En otra forma de realización la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes del uso.

En otra forma de realización la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo liofilizada o secada por rociado) lista para su uso sin disolución anterior.

50 En un aspecto adicional la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto según la presente invención, y un tampón, en donde dicho compuesto está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml o por encima, y en donde dicha formulación tiene un pH desde aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 9,0. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,5. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 7,0. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 7,5. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 9,0. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8,5. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,5.
55 60

En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación es desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,0. En otra forma de realización de la invención el pH de la formulación farmacéutica es desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 8,5.

65 En una forma de realización adicional de la invención el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio,

hidrogenofosfato disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminoetano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

5 En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización adicional de la invención el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropan-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una forma de realización el conservante es fenol o m-cresol. En una forma de realización es conservante es fenol o m-cresol. En una forma de realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml hasta 20 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración desde 5 mg/ml hasta 10 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración desde 10 mg/ml hasta 20 mg/ml. Cada una de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

20 En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un agente isotónico. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o poliol, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o mezclas de los mismos. En una forma de realización el agente de isotonicidad es polietilenglicol. Se puede usar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa sódica. En una forma de realización el aditivo glucídico es sacarosa. Se define el poliol como un hidrocarburo de C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una forma de realización el aditivo poliol es manitol. Los azúcares o polioles mencionados anteriormente se pueden usar individualmente o en combinación. No hay límite fijado respecto a la cantidad usada, siempre que el azúcar o poliol sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente a los efectos estabilizantes alcanzados usando los métodos de la invención. En una forma de realización, la concentración del azúcar o poliol está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración desde 1 mg/ml hasta 50 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración desde 1 mg/ml hasta 7 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración desde 5 mg/ml hasta 7 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración desde 8 mg/ml hasta 24 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración desde 25 mg/ml hasta 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

50 En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un agente quelante. En una forma de realización adicional de la invención el agente quelante se selecciona de sales del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En una forma de realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración desde 0,1 mg/ml hasta 2 mg/ml. En una forma de realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración desde 2 mg/ml hasta 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

60 En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

65 Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente muestre formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Mediante "formación de agregados" se quiere decir una interacción física entre las moléculas de polipéptido que produce la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o agregados visibles grandes que precipitan de la solución. Mediante "durante el

almacenamiento” se quiere decir que una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Más bien, después de la preparación, se embala para su almacenamiento, bien en forma líquida, en un estado congelado, o en una forma seca para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Mediante “forma seca” se quiere decir que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca bien por secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por rociado (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, R.U.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente a la actividad biológica de ese polipéptido, lo que produce pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tal como bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición que contiene el polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácidos suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Mediante “base de aminoácidos” se quiere decir un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido determinado está presente bien en su forma de base libre o en su forma de sal. Donde se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una forma de realización, los aminoácidos para usar en preparar las composiciones de la invención son los que tienen una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una mezcla de los mismos) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente bien en su forma de base libre o su forma de sal. En una forma de realización se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Mediante “análogo de aminoácido” se quiere decir un derivado de un aminoácido natural que produce el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones bien en su forma de base libre o su forma de sal. En una forma de realización adicional de la invención los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína. En una forma de realización adicional de la invención se puede añadir metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Mediante “inhibir” se quiere decir acumulación mínima de especies oxidadas de metionina durante el tiempo. Inhibir la oxidación de metionina produce mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos. La cantidad que se va a añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente del 10% hasta aproximadamente el 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede lograr añadiendo metionina de modo que la proporción de metionina añadida respecto a los residuos de metionina varía desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una forma de realización adicional de la invención el estabilizante se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de las mismas ((por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancia que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que aumentan más la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en la misma. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen, pero no están limitados a, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada con congelación/descongelación o cizalla mecánica.

En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además un tensioactivo. En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes. El término “tensioactivo” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula o ion que está compuesta de

una parte soluble en agua (hidrofílica), la cabeza, y un segmento soluble en lípidos (lipofílica). Los tensioactivos se acumulan preferiblemente en interfases, en las que la parte hidrofílica se oriente hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia la fase oleaginosa o hidrofóbica (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la que los tensioactivos empiezan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Además, los tensioactivos disminuyen la tensión de superficie de un líquido. Los tensioactivos también se conocen como compuestos anfipáticos. El término “detergente” es un sinónimo usado para tensioactivos en general.

Los tensioactivos **aniónicos** se pueden seleccionar del grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal de sodio del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, docusato de sodio, ácido glicoquenodesoxicólico sódico, ácido glicólico hidrato, ácido glicodesoxicólico monohidrato, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal 3-sulfato disódica del ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal de sodio de N-laurilsarcosina, dodecil sulfato de litio, lugol, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidrato, 2-bromoetanosulfonato de sodio, colato de sodio hidrato, bilis de buey u oveja, colato de sodio hidrato, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico monohidrato, sal 3-sulfato disódica del ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico, dodecil sulfato Trizma®, DSS (docusato de sodio, registro CAS no. [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS no [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS no. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), dodecilsulfocolina (FOS-colina-12), decilsulfocolina (FOS-colina-10), nonilsulfocolina (FOS-colina-9), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico.

Los tensioactivos **catiónicos** se pueden seleccionar del grupo de: bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiodecilsulfato de sodio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio, y/o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio.

Los tensioactivos **no iónicos** se pueden seleccionar del grupo de: BigCHAP, Bis(polietilenglicol bispimidazolil carbonil)), copolímeros en bloque como óxido de polietileno/óxido de polipropileno copolímeros en bloque tales como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij®35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij®92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, éter monododecílico de decaetilenglicol, N-decanoil-N-metil-glucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamina, poliglicósidos de alquilo, aceite de ricino etoxilado, éter monodecílico de heptaetilenglicol, éter monodecílico de heptaetilenglicol, éter monotetradecílico de heptaetilenglicol, éter monodecílico de hexaetilenglicol, éter monohexadecílico de hexaetilenglicol, éter monooctadecílico de hexaetilenglicol, éter monotetradecílico de hexaetilenglicol, Igepal CA-630, Igepal CA-630, metil-6-0-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, éter monodecílico de nonaetilenglicol, N-nonanoil-N-metilglucamina, N-nonanoil-N-metilglucamina, éter monodecílico de octaetilenglicol, éter monodecílico de octaetilenglicol, éter monohexadecílico de octaetilenglicol, éter monooctadecílico de octaetilenglicol, éter monotetradecílico de octaetilenglicol, octil-p-D-glucopiranosido, éter monodecílico de pentaetilenglicol, éter monodecílico de pentaetilenglicol, éter monohexadecílico de pentaetilenglicol, éter monohexílico de pentaetilenglicol, éter monooctadecílico de pentaetilenglicol, éter monooctadecílico de pentaetilenglicol, éter diglicídico de polietilenglicol, éter de polietilenglicol W-1, éter tridecílico de polioxietileno 10, estearato de polioxietileno 100, éter isohexadecílico de polioxietileno 20, éter oleico de polioxietileno 20, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, polioxietileno bis(imidazolil carbonil), estearato de polioxietileno 25 propilenglicol, saponina de corteza de Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, Tipo 15-S-12, Tergitol, Tipo 15S-30, Tergitol, Tipo 15-S-5, Tergitol, Tipo 15-S-7, Tergitol, Tipo 15-S-9, Tergitol, Tipo NP-10, Tergitol, Tipo NP-4, Tergitol, Tipo NP-40, Tergitol, Tipo NP-7, Tergitol, Tipo NP-9, tetradecil-β-D-maltósido, éter monodecílico de tetraetilenglicol, éter monodecílico de tetraetilenglicol, éter monotetradecílico de tetraetilenglicol, éter monodecílico de trietilenglicol, éter monodecílico de trietilenglicol, éter monohexadecílico de trietilenglicol, éter monooctadecílico de trietilenglicol, éter monotetradecílico de trietilenglicol, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton® X-100, Triton® X-114, solución de Triton® X-165, solución de Triton® X-305, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglucolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos, y/o n-undecil β-D-glucopiranosido.

Los tensioactivos **dipolares** se pueden seleccionar del grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3-(decilmetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecilmetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecilmetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (sal interna

de 3-(N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(octildimetilamonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglucolípidos (galactopiranosido), alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi (éter de alquilo) - derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo derivados laurilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^{beta}-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^{beta}-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N^{beta}-acilados de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C₆-C₁₂ (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N,N-dimetil-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos aniónicos (alquil-aril-sulfonatos) monovalentes, palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), o mezclas de los mismos.

El término "alquil-poliglucósidos" como se usa en el presente documento se refiere a un cadena de alquilo, alqueno o alquino de C₅₋₂₀ que está sustituida por una o más fracciones glucósido tal como maltósido, sacárido, etc. Formas de realización de estos alquil-poliglucósidos incluyen alquil de C₆₋₁₈-poliglucósidos. Las formas de realización específicas de estos alquil-poliglucósidos incluyen las cadenas de carbono numeradas en par tal como cadena de alquilo de C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Las formas de realización específicas de las fracciones glucósido incluyen piranosido, glucopiranosido, maltósido, maltotriosido y sacarosa. En formas de realización de la invención se unen menos de 6 fracciones glucósido al grupo alquilo. En formas de realización de la invención se unen menos de 5 fracciones glucósido al grupo alquilo. En formas de realización de la invención se unen menos de 4 fracciones glucósido al grupo alquilo. En formas de realización de la invención se unen menos de 3 fracciones glucósido al grupo alquilo. En formas de realización de la invención se unen menos de 2 fracciones glucósido al grupo alquilo. Formas de realización específicas de alquil-poliglucósidos son alquil glucósidos tales como n-decil-β-D-glucopiranosido, decil-β-D-maltopiranosido, dodecil-β-D-glucopiranosido, n-dodecil-β-D-maltósido, n-dodecil-β-D-maltósido, tetradecil-β-D-glucopiranosido, decil-β-D-maltósido, hexadecil-β-D-maltósido, decil-β-D-maltotriosido, dodecil-β-D-maltotriosido, tetradecil-β-D-maltotriosido, hexadecil-β-D-maltotriosido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa. El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, 1995.

En una forma de realización adicional de la invención la formulación comprende además inhibidores de proteasas tal como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y benzamida HCl, pero también se pueden usar otros inhibidores de proteasas comercialmente disponibles. El uso de un inhibidor de proteasas es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un ion dipolar (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto según la presente invención se pueden administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y mucosa, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración de composiciones farmacéuticas según la invención puede ser a través de varias rutas de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, yugal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de las mismas, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretal y parenteral a pacientes en necesidad de tal tratamiento.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, bálsamos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina duras y cápsulas de gelatina blandas, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, nebulizadores, polvo, aerosoles, inhaladores, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, óvulos vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución de inyección, soluciones que se transforman in situ, por ejemplo, gelificación in situ, endurecimiento in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión, e implantes. Las composiciones de la invención pueden además estar compuestas en, o unidas a, por ejemplo, mediante

interacciones covalentes, hidrofóbicas o electrostáticas, un soporte de fármacos, sistema de administración de fármacos y sistema de administración de fármacos avanzado para aumentar más la estabilidad del compuesto de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr cronoterapia bien conocida para los expertos en la materia, y aumentar el cumplimiento terapéutico del paciente o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos de soportes, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, pero no están limitados a, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol polivinílico, polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas soporte, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo, sistemas copoliméricos en bloque bien conocidos para los expertos en la materia, micelas, liposomas, microsferas, nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma de, bien conocido para los expertos en la materia del comportamiento de fase en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionante, automicroemulsionante, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar de compuestos de la presente invención usando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, que son todos dispositivos que conocen bien los expertos en la materia. Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistema de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retrasada y lenta. Más específicamente, pero no limitado a, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas parenterales de liberación controlada y liberación sostenida (ambos sistemas producen una reducción de varias veces en el número de administraciones), bien conocidos para los expertos en la materia. Incluso más preferiblemente, son sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados subcutáneos. Sin limitar el ámbito de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microsferas, nanopartículas. Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogenización a alta presión, encapsulación, secado por rociado, microencapsulación, coacervación, separación de fase, evaporación de solvente para producir microsferas, extrusión y procesos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000). La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión o un polvo para la administración del compuesto de la presente invención en forma de un aerosol líquido o en polvo nasal o pulmonar. Como una opción aún adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o transmucosa, por ejemplo, administración yugal. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a través de la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco usando cualquier tipo conocido de dispositivo adecuado para la administración pulmonar de fármacos. Los ejemplos de estos comprenden, pero no están limitados a, los tres tipos generales de generadores de aerosoles para la administración pulmonar de fármacos, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medida, o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basado en metodología de ensayos estandarizados, se define el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula como el diámetro geométrico equivalente de una partícula esférica estándar de referencia de densidad unidad (1 g/cm^3). En el caso más sencillo, para partículas esféricas, d_a se relaciona a un diámetro de referencia (d) como una función de la raíz cuadrada de la relación de densidad como se describe mediante:

Se producen modificaciones a esta relación para partículas no esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" están bien descritos y se conocen en la técnica (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R y representa una medida del valor mediana de una distribución de tamaño de partícula aerodinámica. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico mediana en masa (MMAD) y el diámetro aerodinámico eficaz mediana en masa (MMEAD) se usan intercambiamente, son parámetros estadísticos y describen empíricamente el tamaño de las partículas del aerosol en relación a su potencial a depositarse en los pulmones, independientemente de la forma, tamaño o densidad real (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). MMAD normalmente se calcula de la medida hecha con impactadores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de la partícula en el aire. En una forma de realización adicional, la formulación se podría aerosolizar por cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para alcanzar un MMAD de las partículas del aerosol de menos de $10 \mu\text{m}$, más preferiblemente

entre 1-5 μm , y lo más preferiblemente entre 1-3 μm . El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más eficaz para la administración de un fármaco al pulmón profundo, donde la proteína se absorbe óptimamente (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385).

El depósito en el pulmón profundo de las formulaciones pulmonares que comprenden el compuesto de la presente invención se puede optimizar además opcionalmente usando modificadores de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero no limitado a: flujo de inhalación lento (por ejemplo, 30 l/min), mantenimiento de la respiración y ritmo de actuación.

El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

El término "estabilidad física" de la formulación de proteína como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con interfases y superficies que son desestabilizantes, tal como superficies e interfases hidrofóbicas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o medidas de turbidez después de exponer la formulación cargada en envases adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz focaliza definida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una formulación que muestra turbidez visual a la luz natural corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica inestable física con respecto a agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz natural. Alternativamente, la turbidez de la formulación se puede evaluar por medidas de turbidez sencillas que conocen bien los expertos en la materia. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas también se puede evaluar usando un agente o sonda espectroscópica del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que preferentemente se une a una conformación no nativa de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura de proteína es tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y tal vez también otras configuraciones proteicas, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y emisión aumentada a aproximadamente 482 nm cuando se une a un forma de proteína en fibrilla. La tioflavina T sin unir es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

Se pueden usar otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de proteínas de estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrofóbico" que se unen preferentemente a parches hidrofóbicos expuestos de una proteína. Los parches hidrofóbicos generalmente están enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero se exponen según una proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes aromáticos, hidrofóbicos, tal como antraceno, acridina, fenantrolina y similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos metal-aminoácido, tal como complejos de metal cobalto de aminoácidos hidrofóbicos, tal como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

El término "estabilidad química" de la formulación de proteína como se usa en el presente documento se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que producen la formación de productos de degradación química con potencial menor potencia biológica y/o potenciales propiedades inmunogénicas aumentadas comparadas con la estructura de proteína nativa. Se pueden formar varios productos de degradación química dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el ambiente al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química lo más probablemente no se puede evitar por completo y con frecuencia se ven cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y uso de la formulación proteica como sabe bien el experto en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que el grupo amida de la cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparraginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que producen la formación de productos de degradación dímeros, oligómeros y polímeros covalentemente unidos (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. & Manning M. C, Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína se puede evaluar midiendo la cantidad de productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación con frecuencia se puede acelerar por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual con frecuencia se determina por separación de los productos de degradación dependiente del tamaño molecular y/o carga usando varias técnicas cromatográficas (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por tanto, como se ha esbozado anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y almacenamiento (según las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que se alcanza la fecha de caducidad.

5 En una forma de realización de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

10 En otra forma de realización de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En una forma de realización adicional de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

15 En una forma de realización aún adicional de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

20 En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento.

25 La presente invención también incluye la forma de sal de análogos de GLP-1. Un análogo de GLP-1 de la invención puede ser suficientemente ácido o suficientemente básico para reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas, y ácidos inorgánicos, para formar una sal. Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición ácida con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tal como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. Los ejemplos de tales sales incluyen el sulfato, hidrosulfato, bisulfato, sulfito, bisulfato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibezoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato, y similares. Las sales de adición ácida preferidas son las formadas con ácidos minerales tal como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico y, especialmente, ácido clorhídrico.

35 Las sales de adición básica incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tal como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, y similares de amonio, metal alcalino o alcalinotérreo. Tales bases útiles en preparar las sales de esta invención incluyen, por tanto, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio, y similares. Las formas de sal de los análogos de GLP-1 son particularmente preferidas. Por supuesto, cuando los compuestos de esta invención se usan para fines terapéuticos, esos compuestos también pueden estar en forma de una sal, pero la sal debe ser farmacéuticamente aceptable.

40 Los análogos de GLP-1 modificados de la invención encuentran múltiples usos incluyendo el uso como un tratamiento para diabetes, un sedante, un tratamiento para trastornos del sistema nervioso, uso para inducir un efecto ansiolítico sobre el SNC, uso para activar el SNC, uso para el tratamiento posoperatorio y como un tratamiento para la resistencia a insulina.

A. Tratamientos de diabetes

50 Los análogos de GLP-1 modificados de la invención generalmente normalizarán la hiperglucemia por mecanismos dependientes de glucosa. Como tal, los análogos de GLP-1 modificados son útiles como agentes primarios para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo II y como agentes adyuvantes para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo I.

55 El uso de una cantidad eficaz de los análogos de GLP-1 modificados como tratamiento para diabetes mellitus tiene la ventaja de ser más potente que GLP-1 sin modificar. Puesto que análogos de GLP-1 modificados son más estables in vivo, se pueden administrar cantidades menores de la molécula para el tratamiento eficaz. La presente invención es especialmente adecuada para el tratamiento de pacientes con diabetes, tanto de tipo I como de tipo II, en que la acción del péptido depende de la concentración de glucosa en la sangre, y por tanto el riesgo de efectos secundarios hipoglucémicos se reduce mucho sobre los riesgos en usar los métodos actuales de tratamiento.

60 La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de la diabetes mellitus en un individuo, en donde dicho método comprende proporcionar una cantidad de los análogos de GLP-1 modificados suficiente para tratar la diabetes; donde la composición contiene un análogo de GLP-1 modificado.

65 B. Tratamiento de trastornos del sistema nervioso central

Los análogos de GLP-1 modificados de la invención también encuentran uso como un sedante. En un aspecto de la invención, se proporciona un método de sedar un sujeto mamífero con una anomalía que produce activación aumentada del sistema nervioso central o periférico usando los análogos de GLP-1 modificados al sujeto en una cantidad suficiente para producir un efecto sedante o ansiolítico en el sujeto. Los análogos de GLP-1 modificados se pueden administrar por vía intracerebroventricular, oral, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Tales métodos son útiles para tratar o aliviar afecciones del sistema nervioso central tales como ansiedad, trastornos de movimiento, agresión, psicosis, convulsiones, ataques de angustia, histeria y trastornos del sueño.

En un aspecto relacionado, la invención abarca un método de aumentar la actividad de un sujeto mamífero, que comprende administrar un análogo de GLP-1 modificado al sujeto en una cantidad suficiente para producir un efecto activador en el sujeto. Preferiblemente, el sujeto tiene una afección que produce activación disminuida del sistema nervioso central o periférico. Los análogos de GLP-1 modificados encuentran uso particular en el tratamiento o mejora de depresión, trastornos esquizoafectivos, apnea del sueño, síndrome de déficit de atención con mala concentración, pérdida de memoria, olvido, y narcolepsia, por nombrar unas pocas afecciones en que la excitación del sistema nervioso central puede ser ventajosa.

Los análogos de GLP-1 modificados de la invención se pueden usar para inducir excitación para el tratamiento o mejora de depresión, trastornos esquizoafectivos, apnea del sueño, síndrome de déficit de atención con mala concentración, pérdida de memoria, olvido, y narcolepsia. La eficacia terapéutica del tratamiento con análogos de GLP-1 modificados se puede seguir mediante entrevistas al paciente para evaluar su afección, por ensayos psicológico/neurológico, o por mejora de los síntomas asociados con estas afecciones. Por ejemplo, seguir la aparición de ataques narcolépticos puede evaluar el tratamiento de narcolepsia. Como otro ejemplo, se pueden probar los efectos de los análogos de GLP-1 modificados sobre la capacidad de un sujeto para concentrarse, o sobre la capacidad de la memoria, usando cualquiera de un número de pruebas diagnósticas que conocen bien los expertos en la materia.

C. Tratamiento posoperatorio

Los análogos de GLP-1 modificados de la invención se pueden utilizar para tratamientos posoperatorios. Un paciente está en necesidad de análogos de GLP-1 modificados de la presente invención durante aproximadamente 1-16 horas antes de que se realice la cirugía en el paciente, durante la cirugía en el paciente, y después de la cirugía en el paciente durante un periodo de no más de aproximadamente 5 días.

Los análogos de GLP-1 modificados de la presente invención se administran desde aproximadamente dieciséis horas hasta aproximadamente una hora antes de que empiece la cirugía. La duración del tiempo antes de la cirugía cuando los compuestos usados en la presente invención se deben administrar para reducir los efectos catabólicos y la resistencia a insulina depende de un número de factores. Estos factores generalmente los conoce el médico e incluyen, más importantemente, si el paciente ha ayunado o se le ha suministrado una infusión de glucosa o bebida o alguna otra forma de sustento durante el periodo preparatorio antes de la cirugía. Otros factores importantes incluyen el sexo, peso y edad del paciente, la gravedad de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de cualquier incapacidad de regular la glucosa en sangre, la gravedad esperada del traumatismo causado por la cirugía, la vía de administración y biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación, y la potencia de los compuestos. Un intervalo de tiempo preferido en el que empezar la administración de los análogos de GLP-1 modificados usado en la presente invención es desde aproximadamente una hora hasta aproximadamente diez horas antes de que empiece la cirugía. El intervalo de tiempo más preferido para empezar la administración es entre dos horas y ocho horas antes de que empiece la cirugía.

La resistencia a insulina después de un tipo particular de cirugía, cirugía abdominal electiva, es más profunda en el primer día posoperatorio, dura al menos cinco días y puede llevar hasta tres semanas de normalizar. Por tanto, el paciente posoperatorio puede estar en necesidad de administración de los análogos de GLP-1 modificados usados en la presente invención durante un periodo de tiempo después del traumatismo de la cirugía que dependerá de factores de si el paciente ha ayunado o se le ha suministrado una infusión de glucosa, o bebida o alguna otra forma de sustento después de la cirugía, y también, sin limitación del sexo, peso y edad del paciente, la gravedad de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de cualquier incapacidad de regular la glucosa en sangre, la gravedad real del traumatismo causado por la cirugía, la vía de administración y biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación, y la potencia de los compuestos administrados. La duración preferida de administración de los compuestos usados en la presente invención no es más de cinco días después de la cirugía.

D. Tratamiento de resistencia a insulina

Los análogos de GLP-1 modificados de la invención se pueden utilizar para tratar la resistencia a insulina independientemente de los usados en tratamiento posoperatorio. La resistencia a insulina puede ser debida a un descenso en la unión de insulina a receptores de superficie celular, o alteraciones en el metabolismo intracelular. El primer tipo, caracterizado como una disminución en la sensibilidad a insulina, típicamente se puede superar por

concentración aumentada de insulina. El segundo tipo, caracterizado por una disminución en la respuesta a insulina, no se puede superar por grandes cantidades de insulina. La resistencia a insulina después de un traumatismo se puede superar por dosis de insulina que son proporcionales al grado de resistencia a insulina, y por tanto está aparentemente causada por una disminución en la sensibilidad a insulina.

La dosis de análogos de GLP-1 modificados eficaz para normalizar el nivel de glucosa en sangre de un paciente dependerá de un número de factores, cantidad que incluyen, sin limitación, el sexo, peso y edad del paciente, la gravedad de la incapacidad de regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de la capacidad de regular la glucosa en sangre, si se administra simultáneamente glucosa u otra fuente de hidratos de carbono, la vía de administración y biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación, y la potencia.

La capacidad de un análogo de GLP-1 de estimular la secreción de insulina se puede determinar proporcionando un análogo de GLP-1 a células animales cultivadas, tal como la línea de células de insulinoma de rata RIN-38, y seguir la liberación de insulina inmunorreactiva (IIR) al medio. Alternativamente se puede inyectar un análogo de GLP-1 a un animal y seguir los niveles en plasma de insulina inmunorreactiva (IIR).

La presencia de IIR se detecta mediante el uso de un radioinmunoensayo, que pueda detectar específicamente insulina. Se puede emplear cualquier radioinmunoensayo capaz de detectar la presencia de IIR; uno de tales ensayos es una modificación del método de Albano, J.D.M. et al., *Acta Endocrinol.* **70**: 487-509 (1972). En esta modificación, se emplea un tampón fosfato/albumina con un pH de 7,4. La incubación se prepara con adición consecutiva de 500 µl de tampón fosfato, 50 µl de muestra de perfundido o estándar de insulina de rata en perfundido, 100 µl de antisuero anti-insulina (Wellcome Laboratories; dilución 1:40.000), y 100 µl de [¹²⁵I]insulina, lo que da un volumen total de 750 µl en un tubo de vidrio desechable de 10×75 mm. Después de la incubación durante 2-3 días a 4°C, la insulina libre se separa de la insulina unida al anticuerpo por separación de carbón. La sensibilidad del ensayo es 1-2 uU/ml. Para medir la liberación de IIR en el medio de cultivo celular de células hechas crecer en cultivo, preferiblemente se incorpora un marcador radioactivo en la proinsulina. Aunque se puede usar cualquier marcador radioactivo capaz de marcar un polipéptido, es preferible usar ³H leucina para obtener proinsulina marcada.

Para determinar si un análogo de GLP-1 tiene propiedades insulínótropas también se puede determinar por infusión pancreática. El ensayo de páncreas de rata perfundido aislado in situ es una modificación del método de Penhos, J. C., et al., *Diabetes*, **18**: 733-738 (1969). Se anestesian ratas de la cepa albino machos de Charles River en ayunas, que pesan 350-600 g, con una inyección intraperitoneal de amital sódico (Eli Lilly and Co., 160 ng/kg). Se ligan los vasos sanguíneos renales, suprarrenales, gástricos, y colónicos inferiores. Se extirpa el intestino entero excepto aproximadamente cuatro cm de duodeno y el colon descendente y recto. Por tanto, solo una parte pequeña del intestino se perfunde, minimizando la posible interferencia por sustancia entéricas con la inmunoreactividad de tipo glucagón. El perfundido es un tampón bicarbonato de Krebs-Ringer modificado con dextrano T70 al 4% y seroalbumina bovina (fracción V) al 0,2%, y se burbujea con O₂ al 95% y CO₂ al 5%. Se usa una bomba que tiene un rodillo de 4 canales, de flujo no pulsátil (Buchler poliestática, Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp), y se logra un cambio de una fuente de perfundido a otra enchufando una llave de paso de tres vías. La manera en que la perfusión se realiza, se sigue y analiza sigue el método de Weir, G. C., et al. *J. Clin. Investigat.* **54**: 1403-1412 (1974), que se incorpora al presente documento mediante referencia.

El tratamiento con un compuesto según la presente invención también se puede combinar con una segunda o más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociadas con la obesidad. Los ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidos, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glucogenesis, moduladores de la absorción de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo lipídico tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que disminuyen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastina, simvastatina, probucol, destrotiroxina, neteglinida, repaglinida; β-bloqueantes tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propanolol, y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benacepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueantes de canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y α-bloqueantes tales como doxazosina, urapidil, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcritos regulados por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de PPY, agonistas de PYY2, agonistas de PYY4, agonistas mezcla de PPY2/PYY4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas β3, agonistas de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de recaptación de serotonina, inhibidores de recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos

5 mezcla de serotonina y adrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona de crecimiento, compuestos liberadores de la hormona de crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tirotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteínas desacoplantes 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor de retinoide X), agonistas TR β ; antagonistas de histamina H₃, agonistas o antagonistas del polipéptido inhibidor gástrico (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina. El tratamiento con un compuesto según esta invención también se puede combinar con cirugía -una cirugía que influye en los niveles de glucosa y/o homeostasis lipídica tal como cerclaje gástrico o derivación gástrica.

10 Se debe entender que cualquier combinación adecuada de los compuestos según la invención con uno o más de los compuestos anteriormente mencionados y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales se consideran que están dentro del ámbito de la presente invención.

15 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no se deben interpretar como limitantes del ámbito de protección. Las características divulgadas en la descripción anterior y en los siguientes ejemplos pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de los mismos, ser material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

20 A modo de ilustración, se proporcionan los siguientes ejemplos para ayudar a describir cómo hacer y practicar las varias formas de realización de la invención. En ninguno modo se pretende que estos ejemplos limiten el ámbito de la invención.

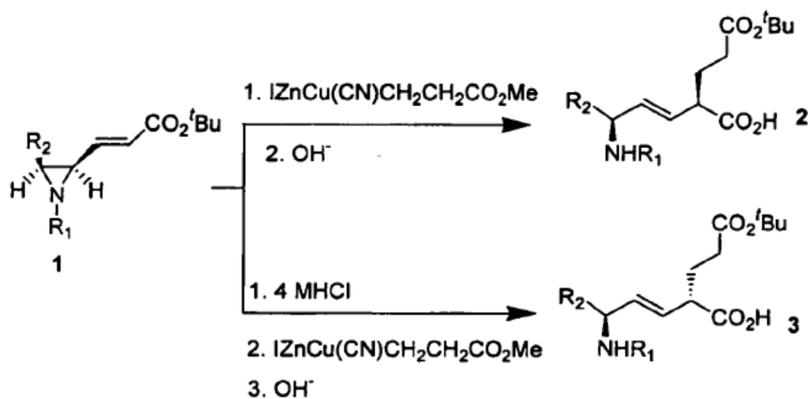
Ejemplos

25 Abreviaturas usadas:

t.a: temperatura ambiente
 DIPEA: diisopropiletilamina
 H₂O: agua
 30 CH₃CN: acetonitrilo
 DMF: N,N-dimetilformamida
 HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
 Fmoc: 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
 Boc: tert-butiloxicarbonilo
 35 OtBu: éster tert-butílico
 tBu: tert-butilo
 Trt: trifenilmetilo
 Pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
 Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo
 40 ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutilo
 Mtt: 4-metiltrilito
 Mmt: 4-metoxitritilo
 DCM: diclorometano
 TIS: triisopropilsilano
 45 TFA: ácido trifluoroacético
 Et₂O: éter dietílico
 NMP: 1-metil-pirrolidin-2-ona
 DIPEA: diisopropiletilamina
 HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
 50 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 DIC: diisopropilcarbodiimida

Síntesis de Q

55 Q tal como los de fórmula II están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares a los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de fórmula II en donde X, Y y R₃ son hidrógeno que se ha descrito (S. Oishi etc., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 2445) se ilustra en el esquema 1.



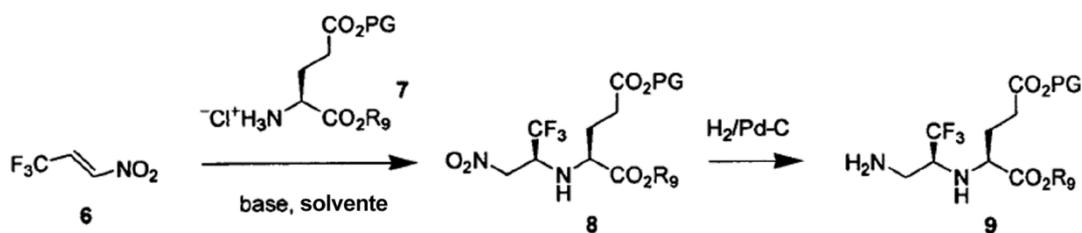
Esquema 1

5 **Q** tal como los de fórmula II están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares a los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de fórmula II en donde X es flúor, Y y R_3 son hidrógeno se ilustra en el esquema 2. El material de partida clave **4** está comercialmente disponible, se conoce en la bibliografía (T. Narumi et al., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 4332)



Esquema 2

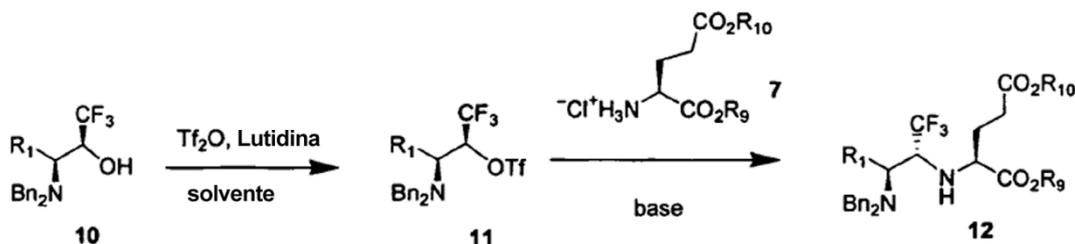
10 **Q** tal como los de fórmula IIIa están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares a los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de fórmula III en donde X es trifluorometilo, Z es nitrógeno, Y, R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno se ilustra en el esquema 3. El material de partida clave 3,3,3-trifluoro-1-nitropeno **6** está comercialmente disponible, se conoce en la literatura. Adición de Aza-Michael del diéster de ácido glutámico a 3,3,3-trifluoro-1-nitropeno **6** de manera estereocontrolada (M. Molteni et al., *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3887).



Esquema 3

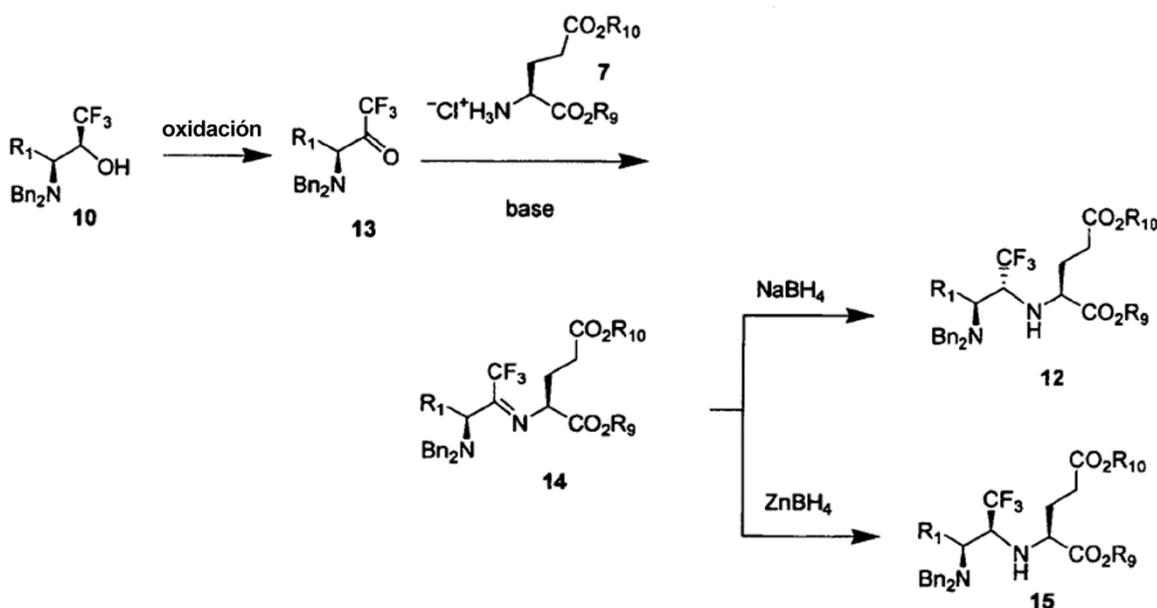
20 **Q** tal como los de fórmula III_b están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares a los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de fórmula III en donde X es trifluorometilo; Z es nitrógeno; R_2 es alquilo; Y, R_1 , y R_3 son hidrógeno se ilustra en el esquema 4. El material de partida **10** está comercialmente disponible, se conoce en la literatura (J. Andre et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1558). El paso clave implica el desplazamiento estereoespecífico de triflato de $\text{S}_{\text{N}}2$ **11** con el diéster del ácido glutámico **7** (P. O'Shea et al., *J. Org. Chem.* **2009**, 5, 1605).

25



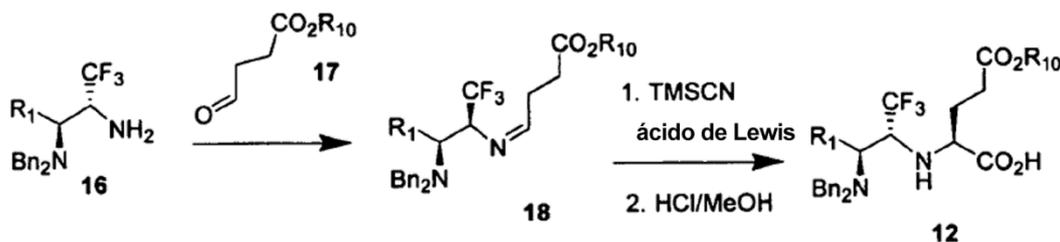
Esquema 4

Alternativamente, **Q** tal como los de fórmula IIIb se prepara por otra ruta sintética en donde X es trifluorometilo; Z es nitrógeno; R₂ es alquilo; Y, R₁, y R₃ son hidrógeno se ilustra en el esquema 5. El material de partida clave **10** (J. Andre et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1558) se oxida para dar la trifluorometilcetona **13**. La posterior formación de imina se completa en la existencia de base. El paso final implica la reducción estereoespecífica de la imina **14** con borohidruro de sodio o borohidruro de zinc para dar los isómeros diastéricos esperados **12** y **15** de A (G. Hugues et al., *Angew Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1839).



Esquema 5

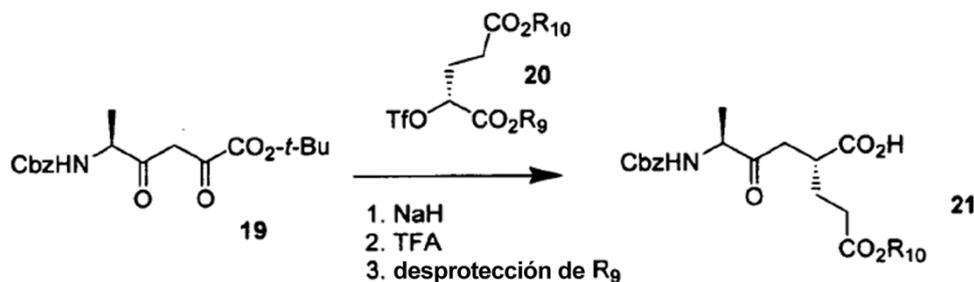
Alternativamente, **Q** tal como los de fórmula IIIb también se prepara por otra ruta sintética en donde X es trifluorometilo; Z es nitrógeno; R₂ es alquilo; Y, R₁, y R₃ son hidrógeno se ilustra en el esquema 6. La condensación del material de partida conocido la diamina **16** (M. Mandal et al., *J. Am Chem. Soc.* **2002**, 6538) con el aldehído **17** da la imina **18**. La siguiente reacción de tipo Strecker diastereoselectiva de la imina **18** con TMS-CN se completa en la existencia de una cantidad catalítica de un ácido de Lewis. El paso final implica la hidrólisis del intermedio ciano para dar el isómero diastérico esperado **12** de A (F. Huguent et al., *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7075).



Esquema 6

Q tal como los de fórmula IV están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares para los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de compuestos de fórmula IV en donde X es oxígeno; Z es carbono; R₂ es alquilo; W, Y, R₁, y R₃ son hidrógeno se ilustra en el esquema 7. El material de partida β-cetoéster **19** está comercialmente disponible, se

conoce en la bibliografía (R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1558). La alquilación del β -cetoéster **19** con el triflato **20**, seguida por descarboxilación y desprotección de R_9 para proporcionar el cetometilenoéster **21** (R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1558; P. S. Dragovich et al., *J. Med Chem.* **1999**, *42*, 1203).



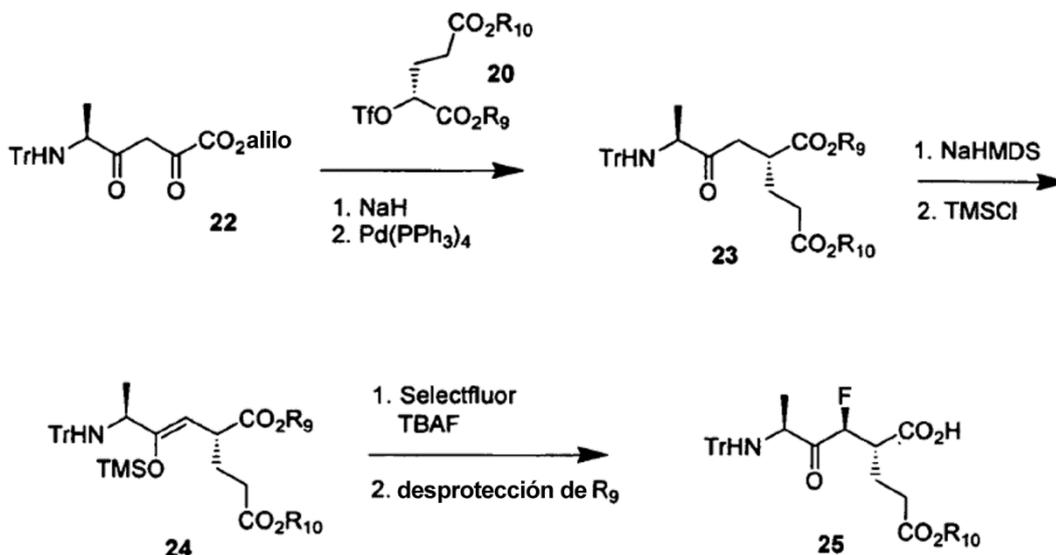
5

Esquema 7

Q tal como los de fórmula IV en donde X es oxígeno; Z es carbono; R_2 es alquilo; W es flúor; Y, R_1 , y R_3 son hidrógeno están comercialmente disponibles, se conocen en la bibliografía o se pueden preparar convenientemente por una variedad de métodos familiares para los expertos en la materia. Una ruta común para la síntesis de esos de fórmula IV se ilustra en el esquema 8. El material de partida β -cetoéster trilado **22** está comercialmente disponible, o se prepara según la bibliografía (R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1558). La alquilación del β -cetoéster **22** con el triflato **20**, seguida por descarboxilación para proporcionar el cetometilenoéster **23**, después **23** se convierte al correspondiente enoléter Z-TMS y se flutura con Selectfluor y desprotección final para proporcionar el monofluorocetometilenoéster **25** (R. Hoffman et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1558; P. S. Dragovich et al., *J. Med Chem.* **1999**, *42*, 1203).

10

15



Esquema 8

20

General

El fragmento peptídico intermedio unido en la resina MBHA se puede producir por química de péptido de fase sólida en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (ABI) 460A usando una resina MBHA (Applied Biosystems Inc., lote # A1A023, 0,77 mmol/g). Todos los aminoácidos tienen sus grupos α -amino protegidos por el grupo tert-butiloxycarbonilo (t-Boc). Esos con cadenas laterales reactivas los tienen protegidos como sigue: Arg (Tos); Lys (Cl-Z); Trp (CHO); Glu (CHex); Tyr (Br-Z); Ser (Bzl); Asp (OBzl); Thr (Bzl).

25

30

Los aminoácidos protegidos se activan en diclorometano (DCM) con medio equivalente de diciclohexilcarbodiimida (DCC) por equivalente de aminoácido para dar el anhídrido simétrico del aminoácido. Sin embargo, los residuos de arginina, glutamina y glicina se activan formando los ésteres de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) de estos aminoácidos (1:1:1 equivalentes de aminoácido, HOBt y DCC en dimetilformamida (DMF)).

35

Los residuos se unen secuencialmente desde el C terminal hacia el extremo N-terminal con una serie de ciclos de acoplamiento y desprotección. Un ciclo de acoplamiento consiste en el aminoácido activado que se somete a sustitución nucleofílica por la amina primaria libre del aminoácido previamente acoplado. La desprotección es la

eliminación del grupo bloqueante N-terminal Boc con ácido trifluoroacético (TFA) anhídrido. Esto genera un grupo amino libre después de la neutralización con diisopropiletilamina (DIEA).

5 La escala de síntesis es 0,5 mmol. La concentración de sitios funcionales en la resina MBHA era 0,77 mmol/g, se usaron 649 g de resina. Un exceso molar de dos veces del anhídrido simétrico es para todos los aminoácidos. La arginina C-terminal se acopla a la resina MBHA mediante protocolos estándar. Todos los residuos están doblemente acoplados. Es decir cada residuo se acopla a la resina dos veces para asegurar la reacción completa del grupo NH₂ en la resina. El segundo acoplamiento se realiza sin un paso de desprotección de Boc anterior a la readición del aminoácido. Esto ayuda a hacer reaccionar completamente los tres grupos amino de la resina. El residuo de triptófano es acopla cuádruplemente. Después del segundo paso de acoplamiento de cada ciclo de acoplamiento 10 doble los grupos terminales Boc se eliminan con TFA anhídrido y se neutralizan con DIEA.

15 El grupo bloqueante de cadena lateral formilo en el residuo de triptófano se elimina con piperidina en DMF antes de cortar el péptido de la resina. Después de transferir la peptidil-resina a un embudo de vidrio sinterizado de 50 ml, se lava varias veces con DCM y DMF. A continuación se añaden 3-5 ml de una solución 50/50 de piperidina/DMF al péptido resina de modo que se cubre solamente. Después de 5 minutos la piperidina/DMF se elimina al vacío y se añaden 3-5 ml de piperidina/DMF. Después de 10 minutos, la piperidina/DMF de nuevo se elimina por filtración al vacío y se añaden 15-20 ml de piperidina/DMF. Después de 15 minutos la piperidina/DMF se elimina y la peptidil-resina se lava con DMF varias veces seguido por DCM. El péptido-resina se coloca después en un horno de vacío 20 (sin calor) para completar la eliminación del solvente.

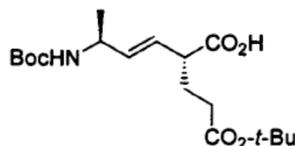
25 Alternativamente, el fragmento peptídico unido a polímero requerido también se puede preparar usando resina MBHA amida de Rink protegida con Fmoc, aminoácidos protegidos con Fmoc, solución de hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) en N,N-dimetilformamida (DMF) y activación con N-metilmorfolina (NMM) y desprotección con piperidina de los grupos Fmoc (paso 1). Cuando se requirió, la desprotección selectiva del grupo Lys (Aloc) se realizó manualmente y se logró tratando la resina con una solución de 3 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ disuelto en 5 ml de CHCl₃:NMM:HOAc (18:1:0,5) durante 2 horas (paso 2). La resina se lavó después con CHCl₃ (6x5 ml), HOAc al 20% en DCM (6x5 ml), DCM (6x5 ml) y DMF (6x5 ml). En algunos casos, la síntesis se reautomatizó después para la adición de un grupo AEEA (ácido aminoetoxietoxiacético), la adición de ácido acético 30 o la adición de un ácido 3-maleimidopropiónico (MAP) (paso 3). El corte de la resina y el aislamiento del producto se realizó usando TFA al 85%/TIS al 5%/tioanisol al 5% y fenol al 5% seguido por precipitación por Et₂O frío en nieve carbónica (paso 4). Los productos se purificaron por HPLC de fase reversa preparativa usando un sistema de HPLC binario preparativo Varian (Rainin): elución en gradiente del 30-55% de B (TFA al 0,045% en H₂O (A) y TFA al 0,045% en CH₃CN (B)) durante 180 minutos a 9,5 ml/min usando una columna Phenomenex Luna 10μ fenil-hexilo, 35 de 21 mm x 25 cm y un detector de UV (Varian Dynamax UVD II) a 214 y 254 nm. La pureza se determinó al 95% por RP-HPLC espectrometría de masas usando un espectrómetro Hewlett Packard de la serie LCMS-1100 equipado con un detector de haz de diodo y usando ionización de electrospray.

40 Los grupos protectores son fracciones químicas utilizadas para proteger los derivados de péptidos de reaccionar consigo mismos. Tales grupos protectores incluyen acetilo, fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC), t-butiloxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (CBZ), y similares. Los aminoácidos protegidos específicos se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

AMINOÁCIDOS NATURALES Y SUS ABREVIATURAS			
NOMBRE	Abreviatura de 3 letras	Abreviatura de 1 letra	Aminoácidos protegidos
Alanina	Ala	A	Fmoc-Ala-OH
Arginina	Arg	R	Fmoc-Arg (pbf)-OH
Asparragina	Asn	N	Fmoc-Asn (Trt)-OH
Ácido aspártico	Asp	D	Fmoc-Asp (tBu)-OH
Cisteína	Cys	C	Fmoc-Cys (Trt)-OH
Ácido glutámico	Glu	E	Fmoc-Glu (tBu)-OH
Glutamina	Gln	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
Glicina	Gly	G	Fmoc-Gly-OH
Histidina	His	H	Fmoc-His(Trt)-OH
Isoleucina	Ile	I	Fmoc-Ile-OH
Leucina	Leu	L	Fmoc-Leu-OH
Lisina	Lys	K	Fmoc-Lys (Mtt)-OH
Metionina	Met	M	Fmoc-Met-OH
Fenilalanina	Phe	F	Fmoc-Phe-OH
Prolina	Pro	P	Fmoc-Pro-OH
Serina	Ser	S	Fmoc-Ser (tBu)-OH
Treonina	Thr	T	Fmoc-Thr (tBu)-OH
Triptófano	Trp	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH
Tirosina	Tyr	Y	Boc-Tyr(tBu)-OH
Valina	Val	V	Fmoc-Val-OH

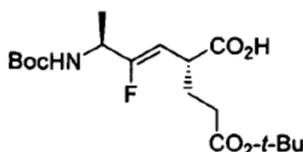
Enlazador Q-a: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-but-1-enil)-pentanodioico



5 Se trata el éster 1-metílico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-but-1-enil)-pentanodioico (*J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **2001**, 2445) (370 mg, 1 mmol) en metanol (2 ml) con LiOH (1 M, 2 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. La mayoría del solvente se evapora al vacío, se diluye con agua (10 ml) y se
10 ajusta el pH a 5, y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3 x 30 ml) para dar el producto del título como espuma (320 mg, 90%).

¹H RMN δ 5,43 (m, 1H), 5,33 (dd, *J*= 15,5, 5,2 Hz, 1H), 4,59 (d, *J*= 7,6Hz, 1H), 3,88 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,25 (m, 2H), 1,91-2,04 (m, 1H), 1,67-1,80 (m, 1 H), 1,57 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,14 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H). LCMS 358 (M⁺+1).

15 Enlazador Q-b: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-fluoro-but-1-enil)-pentanodioico



20 **Paso A: Preparación de ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-fluoro-but-1-enil)-pentanodioico 1-(*S*) sultam**

Se añade ácido 5-*tert*-butoxicarbonilamino-4-fluoro-2-(3-hidroxi-propil)-hex-3-enoico (*S*) sultam (*Tetrahedron*, **2008**,
64, 4332) (502 mg, 1 mmol) en DMF (5 ml) a PDC (dicromato de piridinio, 2,5 mmoles) y la solución resultante se
25 agita a temperatura ambiente durante 64 horas. La mezcla de reacción se diluye con salmuera (20 ml) y se extrae con acetato de etilo (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se secan sobre MgSO₄ y el solvente se evapora a presión reducida. El residuo se purifica por columna rápida para dar el ácido como espuma (425 mg, 79%), que se usa sin más purificación.

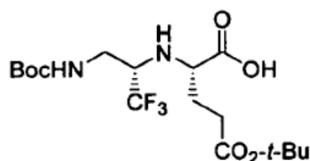
30 **Paso B: Preparación de éster 5-*tert*-butílico 1-(*S*) sultam del ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-fluoro-but-1-enil)-pentanodioico**

Se trata el ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-fluoro-but-1-enil)-pentanodioico 2-(*S*) sultam del paso A (400
35 mg, 0,75 mmoles) en diclorometano (10 ml) con *tert*-butanol (0,5 ml, 10 equiv), DCC (1,5 mmoles) y DMAP (1,5 mmoles). La mezcla de reacción se agita 24 horas antes de diluirla con salmuera (20 ml), extraer con acetato de etilo (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se secan sobre MgSO₄ y el solvente se evapora a presión reducida. El residuo se purifica por columna rápida para dar el éster *tert*-butílico como espuma (425 mg, 79%). ¹H RMN δ 5,33 (m, 1H), 4,54 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,37 (s, 2H), 3,23 (m, 1H), 2,25 (m, 2H), 1,91-2,14 (m, 4H), 1,67-1,80 (m, 5H), 1,57 (s, 9H), 1,47 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,14 (s, 3H). LCMS 574 (M⁺+1).

40 **Paso C: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*S*,5*R*-2-(3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-fluoro-but-1-enil)-pentanodioico**

A una solución del éster *tert*-butílico del paso B (410 mg, 0,72 mmoles) y H₂O₂ acuoso al 50% (260 ml, 3,6 mmoles)
45 en THF-H₂O (5:1, 12 ml) a 0°C se añade LiOH (1 N, 1,44 ml), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ajustar el pH a 5, la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄. El solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente ácido como espuma (262 mg, 95%). ¹H RMN δ 5,23 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 3,11 (m, 1H), 2,45 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 1,47 (s, 9H). LCMS 376 (M⁺+1).

50 Enlazador Q-c: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*R*,5*R*-2-[1-(*tert*-butoxicarbonilamino-metil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-pentanodioico



Paso A: Preparación del éster 1-metilico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*R*,5*R*-2-[1-(*tert*-butoxicarbonilamino-metil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-pentanodioico

5

A una solución de la sal clorhidrato del éster 1-metilico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2-(1-aminometil-2,2,2-trifluoro-etilamino)-pentanodioico (*Org. Lett.*, **2003**, **5**, 3887) (364 mg, 1 mol) y Boc_2O (260 mg, 1,2 mmoles) en diclorometano (15 ml) a 0°C se añade una solución de DIPEA (0,2 ml, 1,5 mmoles) en diclorometano (1 ml), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se diluye con acetato de etilo (30 ml). La mezcla se lava con HCl 0,1 N, salmuera y se seca sobre MgSO_4 . El solvente se evapora a presión reducida y seguido por FC para dar el correspondiente diéster como espuma (420 mg, 85%). $^1\text{H RMN } \delta$ 4,54 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,45 (m, 1H), 3,11 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 1,47 (s, 9H). LCMS 430 (M^+ +1), 330 (M^+ +1-*tert*-Bu).

10

15

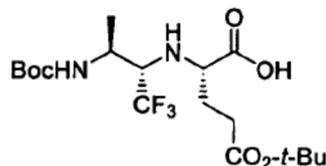
Paso B: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*R*,5*R*-2-[1-(*tert*-butoxicarbonilamino-metil)-2,2,2-trifluoro-etilamino]-pentanodioico

A una solución de del éster *tert*-butílico del paso A (420 mg, 0,92 mmoles) en THF- H_2O (5:1, 12 ml) a 0°C se añade LiOH (1 N, 1,44 ml), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ajustar el pH a 5, la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO_4 . El solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente ácido como espuma (362 mg, 92%). $^1\text{H RMN } \delta$ 4,50 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 3,11 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,52 (s, 9H), 1,47 (s, 9H). LCMS 430 (M^+ +1), 330 (M^+ +1-*tert*-Bu).

20

25

Enlazador Q-d: Preparación del éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*R*-2-(1*S*,2*S*-2-*tert*-butoxicarbonilamino-1-trifluoro-metil-propilamino)-pentanodioico



30

Paso A: 2-trifluorometanosulfonato de 2*S*,3*S*-3-dibencilamino-1,1,1-trifluorobutano

A una solución de 2*S*,3*S*-3-dibencilamino-1,1,1-trifluoro-butan-2-ol (*Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1558) (3,23 g, 10 mmoles) y 2,6-lutidina (1,7 g, 16 mmoles) en *c*-hexano (25 ml) a -10°C se añade anhídrido triflico (4,2 g, 15 mmoles) a una velocidad para mantener la temperatura <10°C y la reacción sigue durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua (25 ml) y *c*-hexano (50 ml). La fase orgánica se lava con HCl 1 N (2 x 15 ml) y salmuera (15 ml). Después de secar sobre MgSO_4 , el solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente trifluorometanosulfonato (4,34 g, 96%).

35

40

Paso B: Éster 5-*tert*-butílico éster 5 -bencilico del ácido 2*S*-2-(1*S*,2*S*-2-dibencilamino-1-trifluorometil-propilamino)-pentanodioico

Se añade carbonato de potasio (2,08 g, 15 mmoles) a una solución del triflato del paso A (4,55 g, 10 mmoles), *c*-hexano (25 ml) y. La mezcla se calienta a 65-70°C durante 24 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se diluye con agua (25 ml) y *c*-hexano (50 ml), después la mezcla se agita durante 10 minutos. Las fases se separan, la fase orgánica se lava con HCl 1 N (2 x 15 ml) y salmuera (15 ml). Después de secar sobre MgSO_4 , el solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente éster (5,88 g, 95%).

45

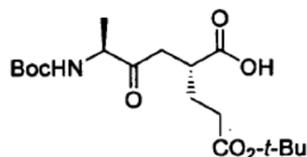
50

Paso C: Éster 5-*tert*-butílico del ácido 2*R*-2-(1*S*,2*S*-2-*tert*-butoxicarbonilamino-1-trifluorometilpropilamino)-pentanodioico

La hidrogenación de una solución del éster 5-*tert*-butílico éster 5 -bencilico del ácido 2*S*-2-(1*S*,2*S*-2-dibencilamino-1-trifluorometil-propilamino)-pentanodioico del paso B (5,4 g, 9 mmoles) se completa en metanol (50 ml) y Pd/C (0,9 g) a 50 Psi durante 24 horas. Después de la filtración para eliminar el catalizador, el filtrado se concentra al vacío. El residuo se disuelve en diclorometano (50 ml) y se trata con Boc_2O (2,60 g, 12 mmoles) en diclorometano (25 ml) a 0°C, y seguido por la adición de una solución de DIPEA (2 ml, 15 mmoles) en diclorometano (10 ml), y la mezcla se

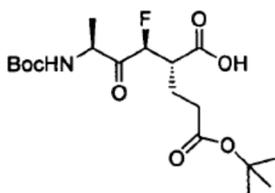
agita a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se diluye con acetato de etilo (60 ml). La mezcla se lava con HCl 0,1 N, salmuera y se seca sobre MgSO₄. El solvente se evapora a presión reducida y seguido por FC para dar el correspondiente compuesto del título como espuma.

5 Enlazador Q-e: **Éster 5-*tert*-butílico del ácido 2S-2-(3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-butil)-pentanodioico**



10 A una solución de éster 1-metilico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2S-2-(3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-2-oxo-butil)-pentanodioico (*J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1203; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5240) (387 mg, 1 mmol) en THF-H₂O (5:1, 12 ml) a 0°C se añade LiOH (1 N, 1,44 ml), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ajustar el pH a 5, la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄. El solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente ácido como espuma (362 mg, 92%). ¹H RMN δ 4,63 (m, 1H), 4,38 (br, 1H), 2,68 (d, *J*= 7,6 Hz, 2H), 2,58 (m, 1 H), 2,25 (dd, *J*=12,3, 7,6 Hz, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,41 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H). LCMS 374 (M⁺+1), 274 (M⁺1-*tert*-Bu).

20 Enlazador Q-f: **Éster 5-*tert*-butílico del ácido 2R-2-(1S,3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-1-fluoro-2-oxo-butil)-pentanodioico**



25 **Paso A: Éster 1-metilico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2S-2-(1S,3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-1-fluoro-2-oxo-butil)-pentanodioico**

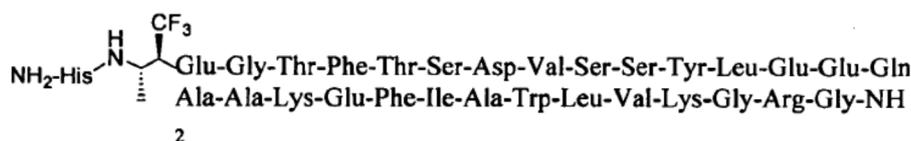
El éster 1-metilico éster 5-bencilico del ácido 2S-2-[1S,3S-fluoro-2-oxo-3-(tritol-amino)-butil]-pentanodioico (581 mg, 1 mmol) y Pd/C al 10% (100 mg) en metanol (25 ml) se hidrogena en un agitador Parr a 50 Psi durante 6 horas. El catalizador se elimina por filtración a través de Celite. El filtrado se concentra. El residuo se disuelve en dioxano (25 ml) y se trata con solución de NaOH 1 N (1,2 ml). Se añade Boc₂O (238 mg, 1,1 mmoles) en dioxano (2 ml) a la solución anterior a 0°C y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se diluye con acetato de etilo (30 ml). La mezcla se lava con HCl 0,1 N, salmuera y se seca sobre MgSO₄. El solvente se evapora a presión reducida. El residuo se disuelve en diclorometano (10 ml), se trata con *tert*-butanol (0,5 ml, 10 quive), DCC (1,5 mmoles) y DMAP (1,5 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas antes de diluirla con salmuera (20 ml), extraer con acetato de etilo (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se secan MgSO₄ y el solvente se evapora a presión reducida. El residuo se purifica por columna rápida para dar el éster *tert*-butílico como espuma (315 mg, 66%). ¹H RMN δ 4,81 (m, 1H), 4,63 (m, 1H), 4,38 (br, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,35 (dd *J*=12,3, 7,6 Hz, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,41 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H). LCMS 406 (M⁺+1), 306 (M⁺1-*tert*-Bu).

40 **Paso B: Éster 5-*tert*-butílico del ácido 2S-2-(1S,3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-1-fluoro-2-oxo-butil)-pentanodioico**

Se añade éster 1-metilico éster 5-*tert*-butílico del ácido 2S-2-(1S,3S-3-*tert*-butoxicarbonilamino-1-fluoro-2-oxo-butil)-pentanodioico del paso A (260 mg, 0,65 mmoles) en THF-H₂O (5:1, 12 ml) a 0°C a LiOH (1 N, 1,0 ml), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ajustar el pH a 5, la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄. El solvente se evapora a presión reducida para dar el correspondiente ácido como espuma (238 mg, 95%). ¹H RMN δ 4,81 (m, 1H), 4,63 (m, 1H), 4,38 (br, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,35 (dd, *J*=12,3, 7,6 Hz, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,41 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H). LCMS 392 (M⁺+1), 292 (M⁺1-*tert*-Bu).

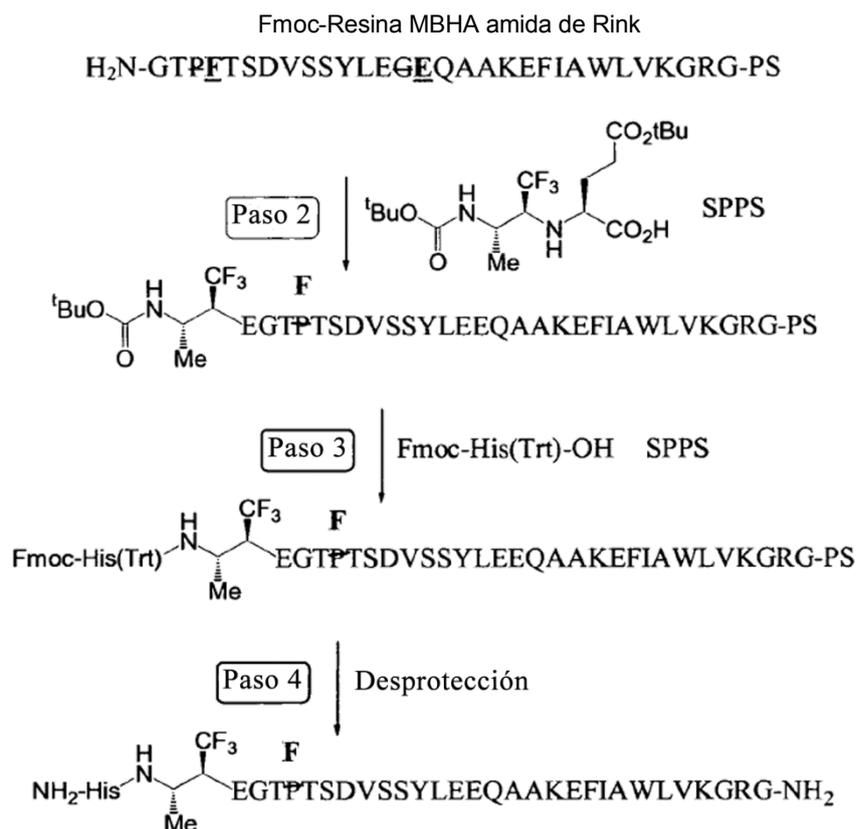
50 **Ejemplo 1**

Síntesis de



[Enlazador Q-d8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido

5 Paso 1



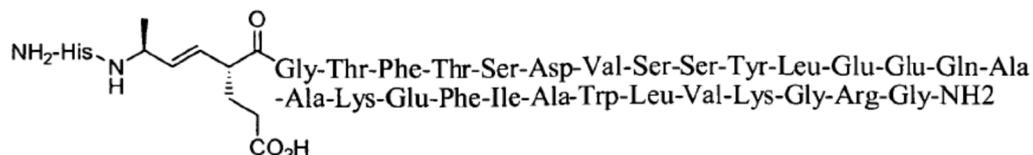
10 La síntesis de péptidos en fase sólida del análogo en una escala de 100 μ moles se realiza usando síntesis de fase
 sólida manual y un sintetizador de péptidos Symphony usando resina MBHA amida de Rink protegida con Fmoc,
 aminoácidos protegidos con Fmoc, solución de hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-uronio
 (HBTU) en N,N-dimetilformamida (DMF) y activación con N-metil morfolina (NMM), y desprotección con piperidina de
 15 los grupos Fmoc (Paso 1). El grupo Boc en el producto del paso 2 se corta antes del acoplamiento con Fmoc-
 His(Trt)-OH. El corte de la resina y el aislamiento del producto se realiza usando TFA al 85%/TIS al 5%/tioanisol al
 5% y fenol al 5%, seguido por precipitación por Et₂O frío en nieve carbónica (paso 2). El producto se purifica por
 HPLC de fase reversa preparativa usando un sistema de HPLC binario preparativo Varian (Rainin): elución en
 20 gradiente del 30-55% de B (TFA al 0,045% en H₂O (A) y TFA al 0,045% en CH₃CN (B)) durante 180 minutos a 9,5
 ml/min usando una columna Phenomenex Luna 10 μ l fenil-hexilo, de 21 mm x 25 cm y un detector de UV (Varian
 Dynamax UVD II) a λ 214 y 254 nm para dar el péptido deseado en una pureza > 95% determinada por RP-HPLC.

Maldi-Tof MS: 3412. MS calculado: 3412.

Ejemplo 2

25

Síntesis de



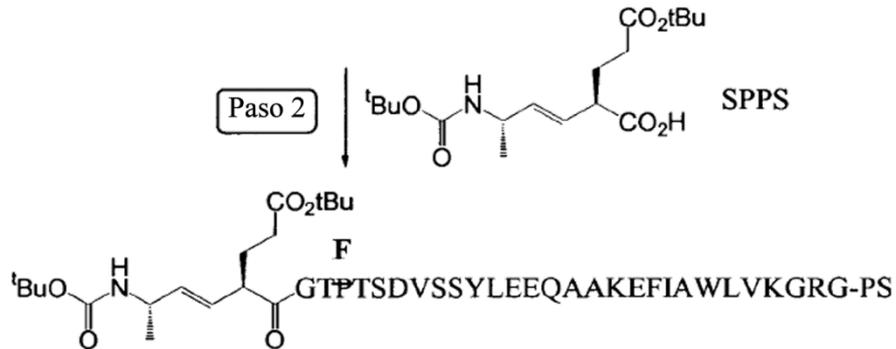
[Enlazador Q-a8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido

Paso 1

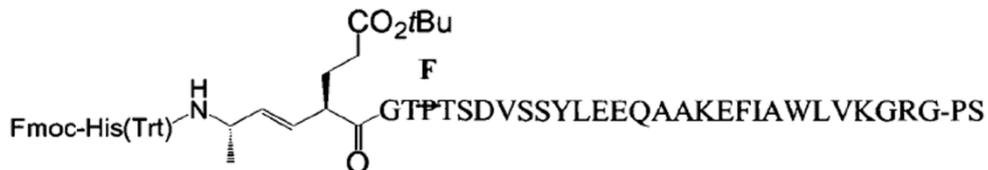
5

Fmoc-Resina MBHA amida de Rink

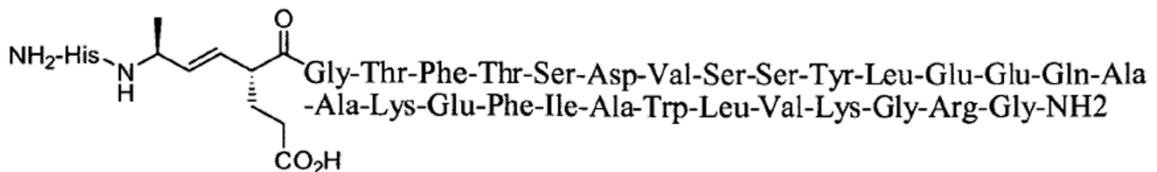
Paso 1 ↓ SPPS



Paso 3 ↓ Fmoc-His(Trt)-OH SPPS



Paso 4 ↓ Desprotección

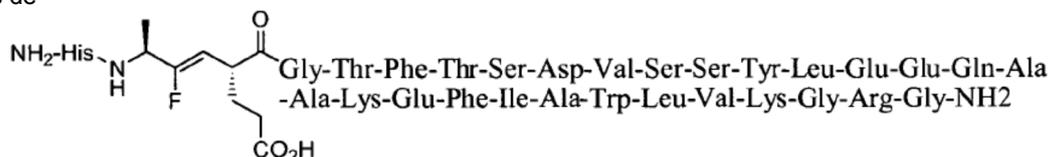


10 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 1.

LCMS: 1113 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1113 (M+3H)³⁺.

15 **Ejemplo 3**

Síntesis de

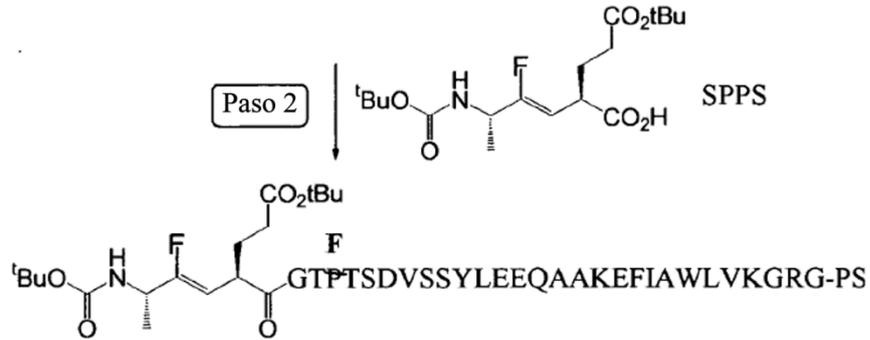


20 [Enlazador Q-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido

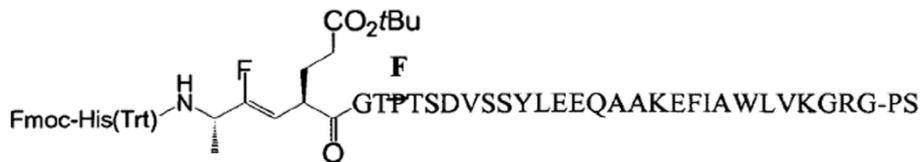
Paso 1

Fmoc-Resina MBHA amida de Rink

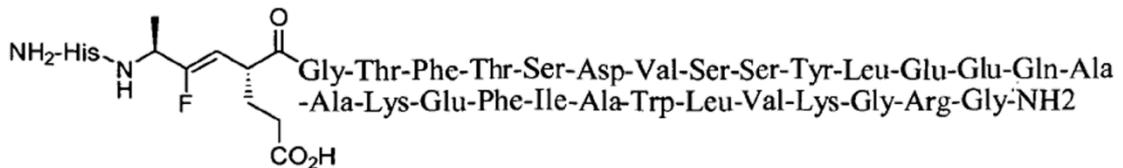
Paso 1 ↓ SPPS



Paso 3 ↓ Fmoc-His(Trt)-OH SPPS



Paso 4 ↓ Desprotección

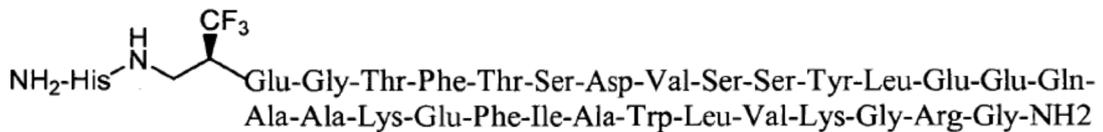


El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 1.

LCMS: 1119 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1119 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 4

Síntesis de

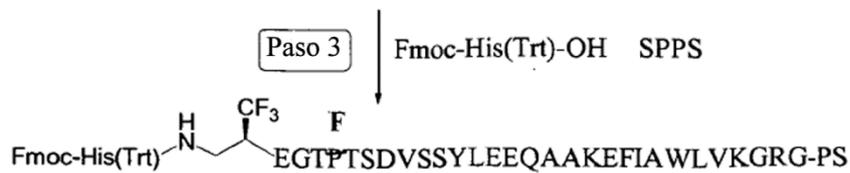
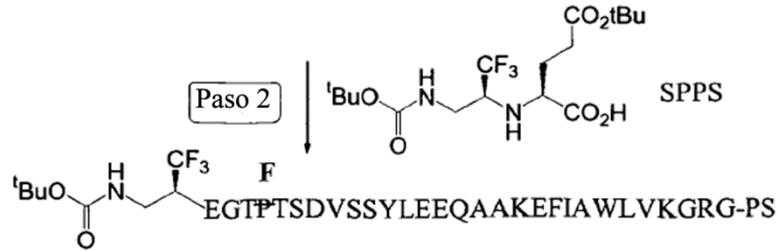


[Enlazador Q-c8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido

Paso 1

Fmoc-Resina MBHA amida de Rink

Paso 1 ↓ SPPS

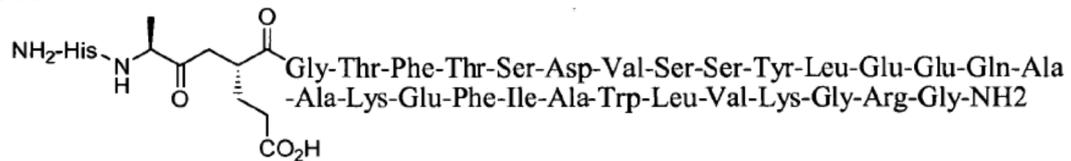


- 5 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 1.

Maldi-Tof MS: 3398. MS calculado: 3398.

10 **Ejemplo 5**

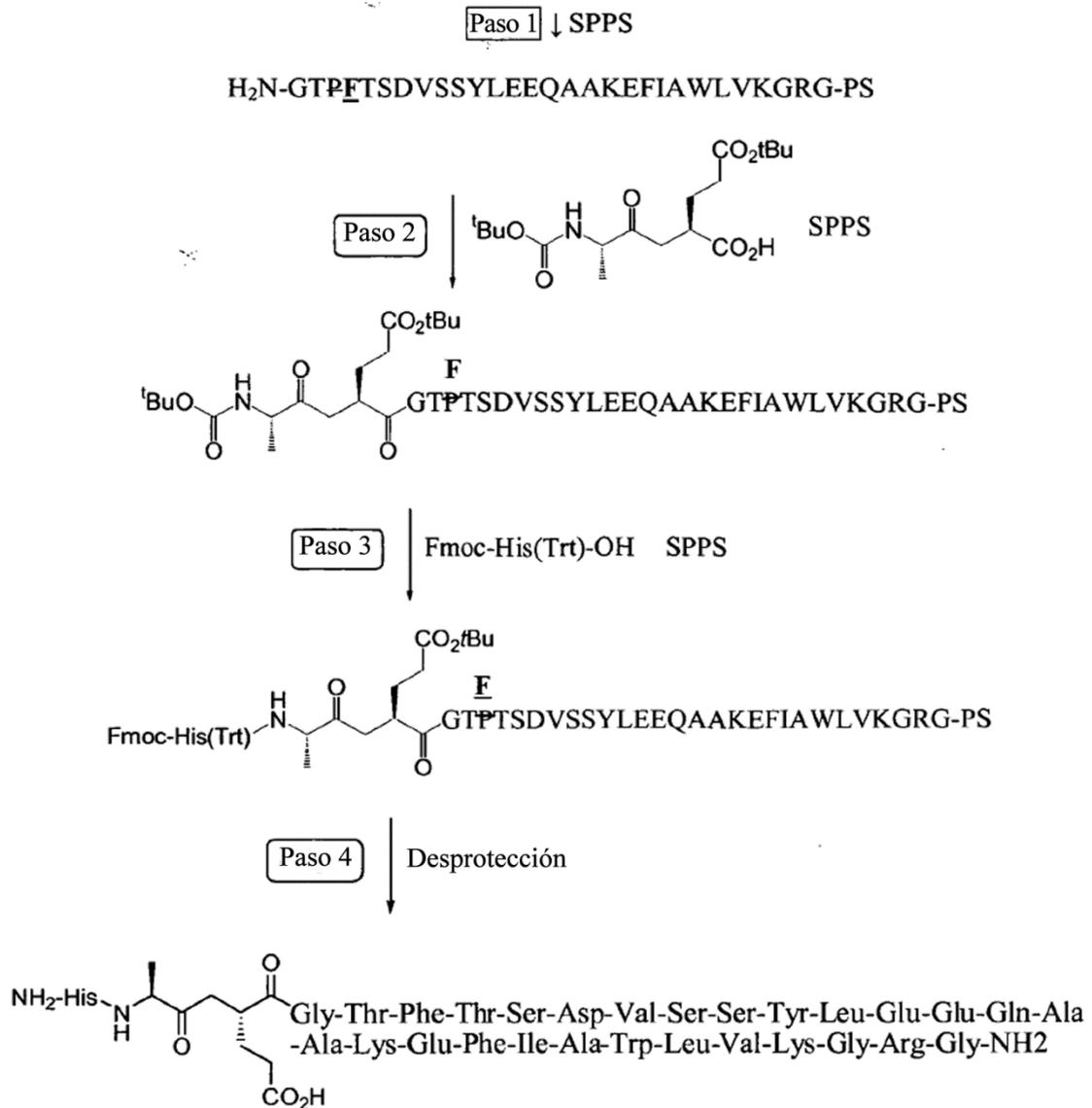
Síntesis de



15 **[Enlazador Q-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido**

Paso 1

Fmoc-Resina MBHA amida de Rink



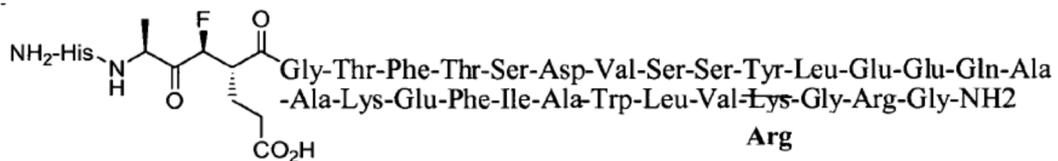
5 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 1.

LCMS: 1118 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1118 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 6

10

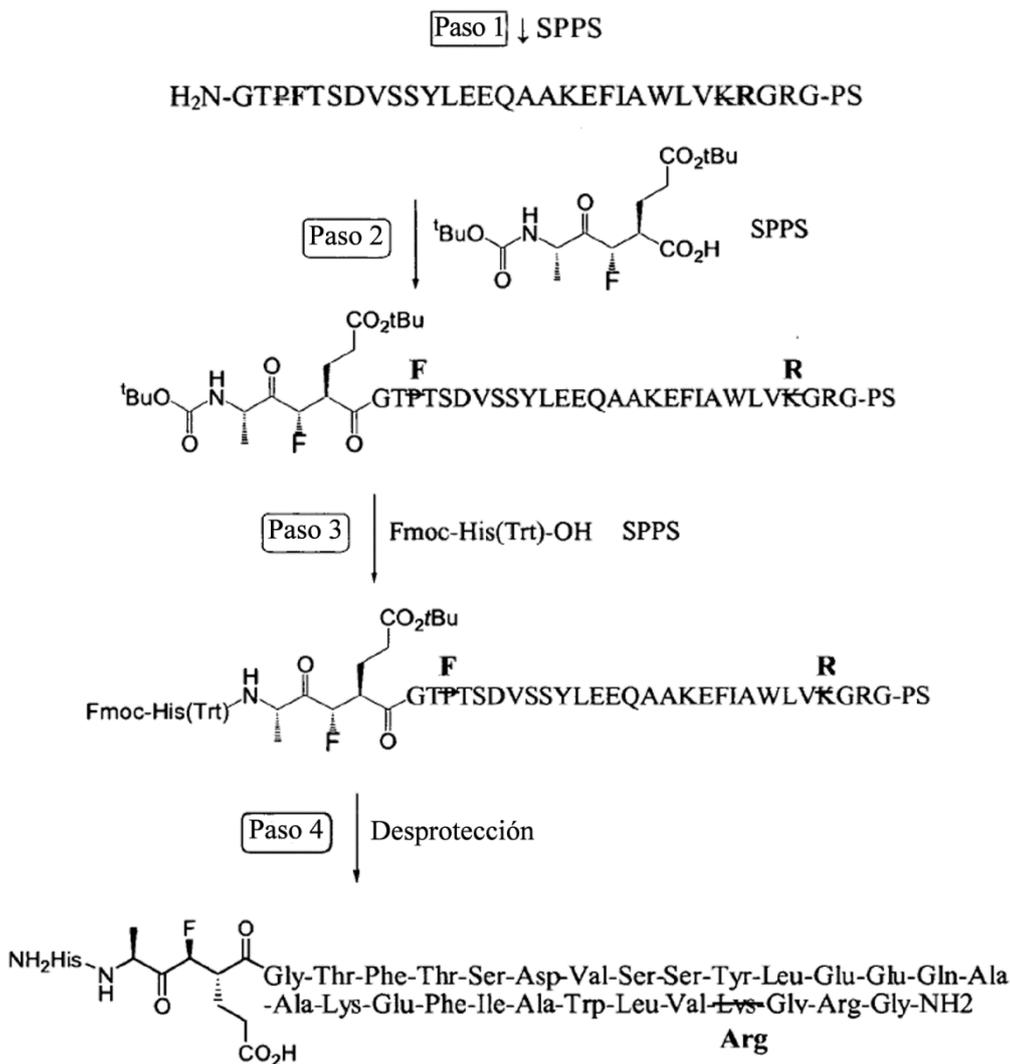
Síntesis de



15 [Enlazador Q-f8-9, Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

Paso 1

Fmoc-Resina MBHA amida de Rink

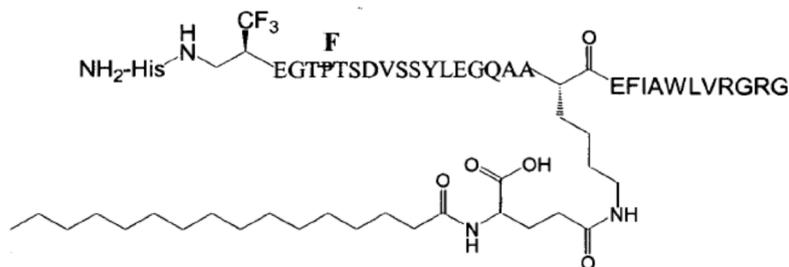


5 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 1.

LCMS: 1127 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1127 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 7

10 Síntesis de



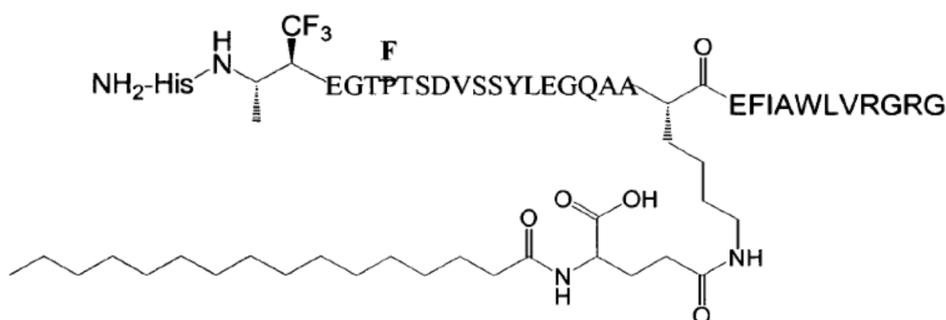
15 **N-ε²⁶-[γ-L-glutamyl(N-α-hexadecanoyl)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido**

20 Una mezcla de [enlazador A-c8,Arg34]GLP-1-OH (3,6 mg 11 μmoles), EDPA (4,0 mg, 30,8 μmoles), acetonitrilo (260 μl) y agua (260 μl) se agitó suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla resultante se añadió una solución de N⁹-hexanodecanoil-Glu(ONSu)-OBu^t (1,8 mg, 3,3 μmoles) en acetonitrilo (44,2 μl) y la mezcla de

reacción se agitó suavemente durante 1 hora y 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se extinguió por la adición de una solución de glicina (1,8 mg, 242 μ moles) en etanol acuoso al 50% (181 μ l). Se añadieron una solución acuosa al 0,5% de acetato de amonio (12 ml) y NMP (300 μ l), y la mezcla resultante se eluyó en un cartucho Varian 1 g C8 Mega Bond Elut®, el compuesto inmovilizado se lavó con acetonitrilo acuoso al 5% (10ml), y por último se liberó del cartucho por elución con TFA (6 ml). El eluato se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente y después se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna y un sistema estándar de acetonitrilo/TFA. El compuesto del título (12 mg, 46%) se aisló, y el producto se analizó por PDMS. Se determinó que el valor de m/z para el ion molecular protonado era 3790 ± 3 . El peso molecular resultante es por tanto 3790 ± 3 uma (valor teórico 3751 uma).

Ejemplo 8

Síntesis de



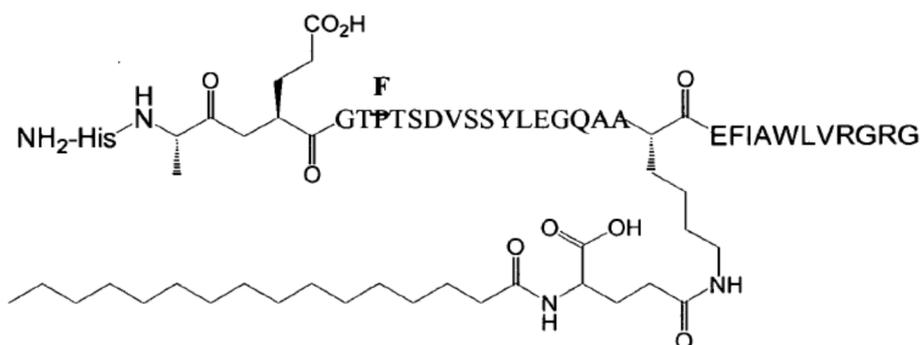
N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamyl(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7.

LCMS: $1268 (M+3H)^{3+}$. MS calculado: $1268 (M+3H)^{3+}$.

Ejemplo 9

Síntesis de



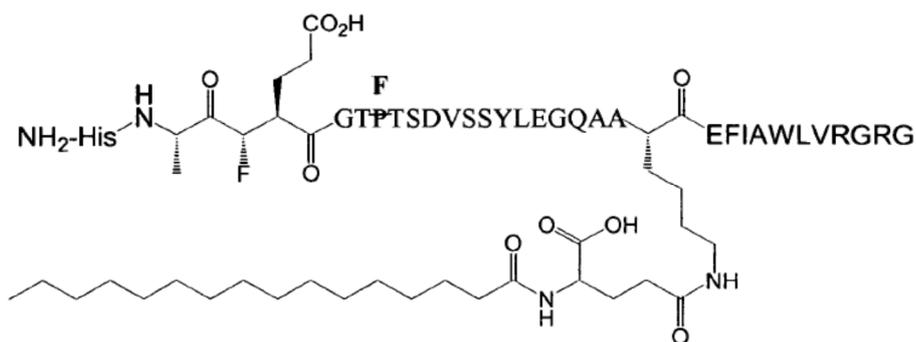
N- ϵ^{26} -[γ -L-glutamyl(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-e8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7.

LCMS: $1250 (M+3H)^{3+}$. MS calculado: $1250 (M+3H)^{3+}$.

Ejemplo 10

Síntesis de



N-ε²⁶-[γ-L-glutamyl(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-f8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

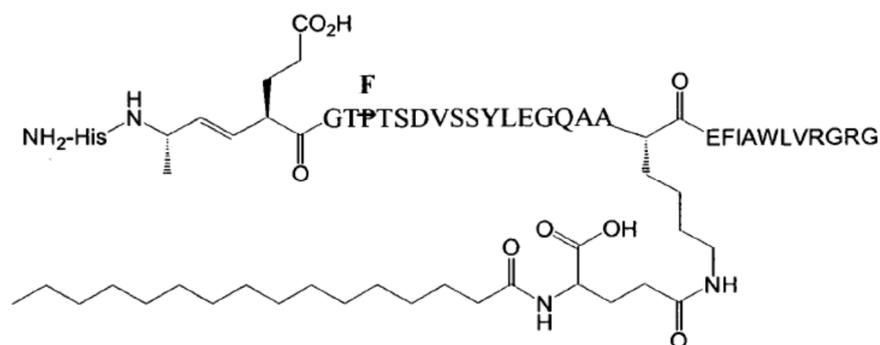
5 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7.

LCMS: 1256 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1256 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 11

10

Síntesis de



15 **N-ε²⁶-[γ-L-glutamyl(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-a8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido**

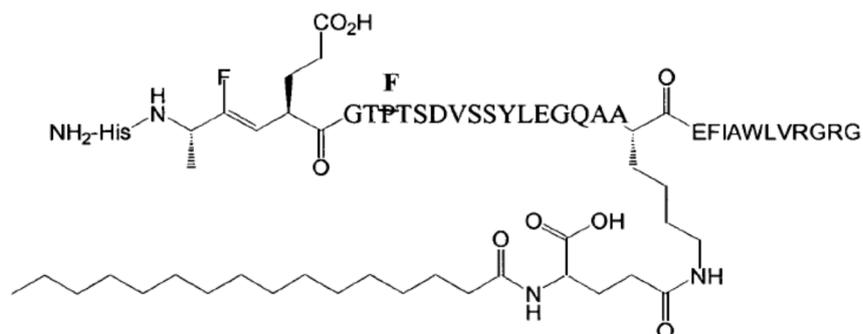
El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7.

20 LCMS: 1244 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1244 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 12

25

Síntesis de



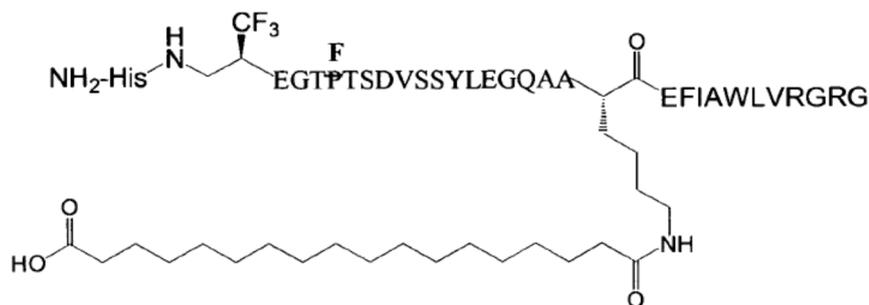
N-ε²⁶-[γ-L-glutamyl(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-b8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

30 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7.

LCMS: 1250 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1250 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 13

5 Síntesis de



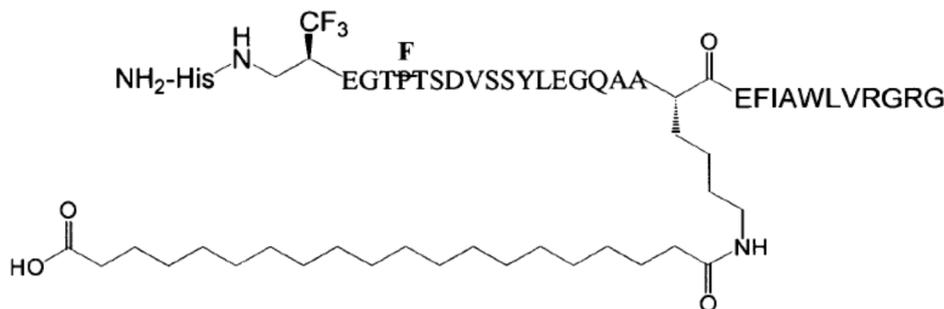
N⁻²⁶-[(N^ε-ω-carboxiheptadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

10 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7 y éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido ω-carboxiheptadecanoico usado como material de partida en lugar de N^α-hexanodecanoil-Glu(ONSu)-OBu^t.

15 LCMS: 1239 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1239 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 14

20 Síntesis de



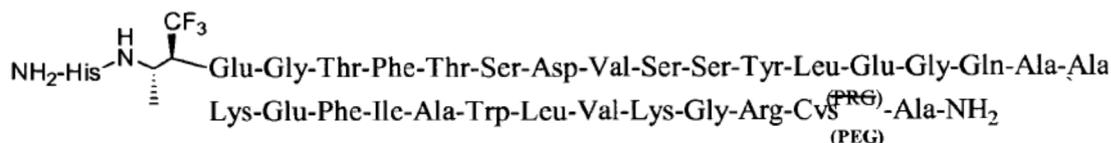
N⁻²⁶-[(N^ε-ω-carboxinonadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

25 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 7 y éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido ω-carboxinonadecanoico usado como material de partida en lugar de N^α-hexanodecanoil-Glu(ONSu)-OBu^t.

30 LCMS: 1249 (M+3H)³⁺. MS calculado: 1249 (M+3H)³⁺.

Ejemplo 15

Síntesis de



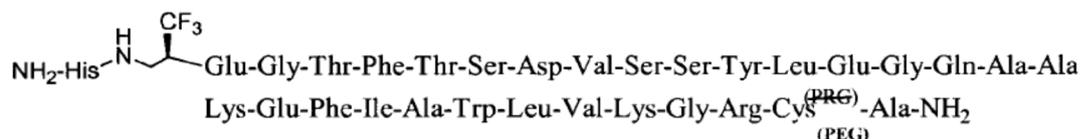
[Enlazador Q-d8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

40 Una mezcla de [enlazador A-d8] GLP-1-(7-37)-Cys-Ala-NH₂ (36 mg, 11 μmoles) en soluciones tampón 50 mmol/l (36 ml) se hizo reaccionar con exceso de 2 moles de mPEG-SPA 20 kDa (pH ajustado de 7,5 a 9,0 con tampón Tris-HCl 50 mmol/l) a temperatura ambiente durante 3 horas. Los conjugados de GLP-1 mono-PEGilados se siguieron y

purificaron por cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (RP-HPLC) en X-tera C18 (4,6 x 250 mm, 5 m, Waters, Milford, MA) a temperatura ambiente. La fase móvil consistía en TFA al 0,1% en agua destilada (eluyente A) y ACN que contenía TFA al 0,1% (eluyente B). La fase móvil se corrió con un gradiente lineal del 30 al 60% del eluyente B durante 20 minutos a una velocidad baja de 1 ml/min y se siguió la absorbancia UV del eluyente a 215 nm. Las fracciones de HPLC correspondientes a los picos respectivos se recogieron por separado, se purgaron con nitrógeno y se liofilizaron.

Ejemplo 16

10 Síntesis de

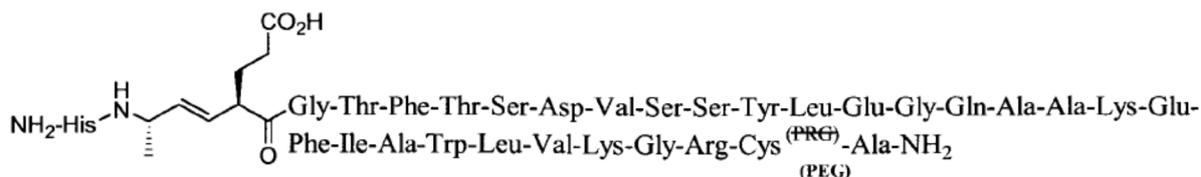


[Enlazador Q-c8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

15 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

Ejemplo 17

20 Síntesis de

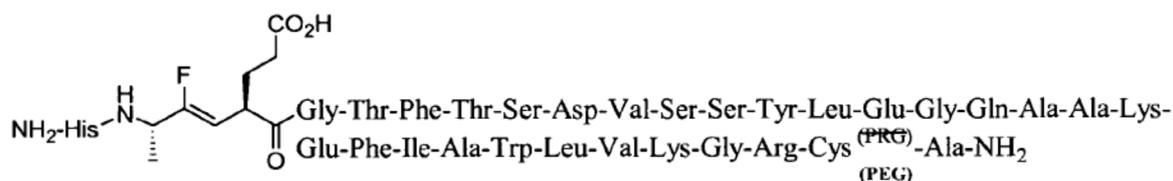


[Enlazador Q-a8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

25 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

Ejemplo 18

30 Síntesis de

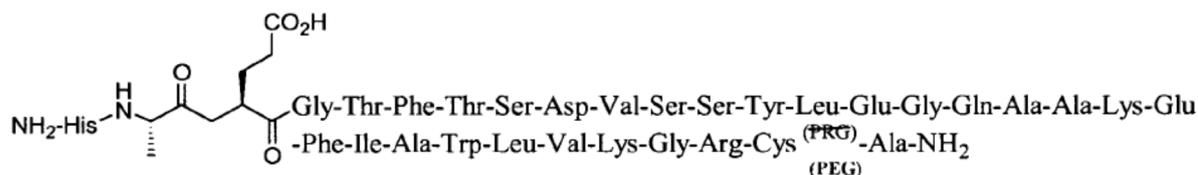


[Enlazador Q-b8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

35 El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

Ejemplo 19

40 Síntesis de



[Enlazador Q-e8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

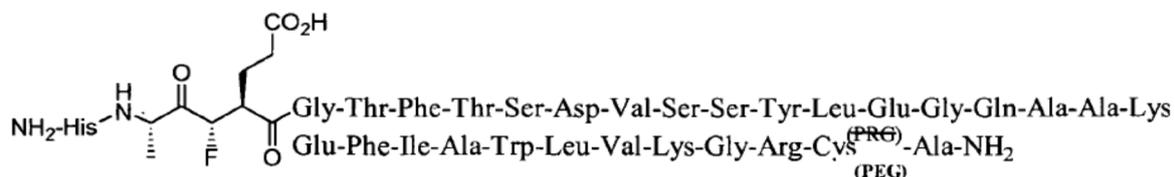
45

El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

Ejemplo 20

5

Síntesis de



10 [Q-enlazador-f8-9JGLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

15 [Enlazador Q-f8-9JGLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂

El análogo de GLP-1 deseado se sintetiza usando la misma secuencia y condiciones que las descritas para el ejemplo 13 y mPEG-SPA 20 kDa usado.

20 Ejemplo 21

Estabilidad a DDP-IV in vitro

25 GLP-1 (100 μ l, 5 nmol/l), una cantidad equivalente de análogos de GLP-1 internamente sintetizados purificados se prepararon en tampón trietilamina HCl (10 mmol/l; pH 7,4). Se añadió DPP-IV (5 mU, 900 μ l), y las soluciones se incubaron a 37°C. En los puntos de tiempo indicados, se retiraron 100 μ l de la mezcla de reacción, y las reacciones se terminaron por la adición de 5 μ l de TFA al 10% (v/v). Cada muestra se analizó por MALDI-TOF MS y RP-HPLC como se describe.

GLP-1 o análogos de GLP-1 más DPP-IV	péptido restante (1 h) (%)	péptido restante (24 h) (%)
GLP-1	20	0
[enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	98	90
[enlazador Q-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	98	92
[enlazador Q-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	98	91
N- ϵ ²⁶ -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	98	98
N- ϵ ²⁶ -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	98	98
N- ϵ ²⁶ -[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-a8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	98	98
[enlazador Q-c8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98
[enlazador Q-b8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98
[enlazador Q-e8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	98	98

30

Ejemplo 22

Formación de AMPc en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado

35 Para demostrar la eficacia de los derivados de GLP-1, se probó su capacidad para estimular la formación de AMPc en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado. Se calculó una CE₅₀ de la curva de dosis y respuesta.

40 En este radioinmunoensayo, se usa NIT-1, una línea de células beta pancreáticas establecida de un ratón transgénico NOD/Lt. El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 μ l. El tampón usado era Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7,4 con la adición de EGTA 1 mmol/l, MgSO₄ 1,5 mmol/l, ATP 1,7 mmol/l, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantina 2 mmol/l, Tween 20 al 0,01% y seroalbúmina humana al 0,1%. Los compuestos cuya actividad agonista se va a ensayar se disolvieron y diluyeron en tampón, se añadieron a preparaciones de membrana y la mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C. La reacción se paró mediante la adición de 25 μ l de HCl 0,05 mmol/l. Las muestras se diluyeron 10 veces antes del análisis para AMPc por un ensayo de proximidad de centelleo.

45

GLP-1 o análogos de GLP-1 más DPP-IV	CE ₅₀ de AMPc basado en célula (pM)
GLP-1	60
[enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	120
[enlazador Q-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	98
[enlazador Q-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido	78
N-ε ²⁶ -[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	68
N-ε ²⁶ -[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	98
N-ε ²⁶ -[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-a8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido	135
[enlazador Q-c8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	168
[enlazador Q-b8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	239
[enlazador Q-e8]GLP-1-(7-37)-Cys ^(PEG) -Ala-NH ₂	334

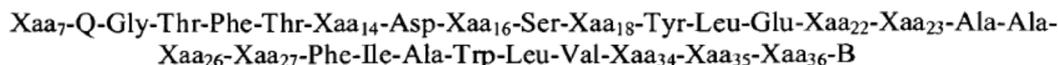
Ejemplo 23

5 Actividad antihiper glucémica de los análogos de GLP-1

Se dividieron ratones con diabetes inducida db/db en 4 grupos (n=5) y se ayunaron durante 16 horas. Se inyectaron por vía intraperitoneal solución salina, 100 µg/kg de GLP-1 (7-36) amida, 100 µg eq/kg de [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido y 100 µg eq/kg de N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido y se administró por vía oral 1 g/kg de solución de glucosa después de 10 minutos. Después de -10, 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos se sacaron muestras de sangre y se midieron los niveles de glucosa en sangre. Los efectos de inhibir el aumento de glucosa en sangre de GLP-1 (7-36) amida, [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido y N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido se compararon calculando el área bajo la curva del nivel de glucosa en sangre respecto al tiempo (0-180 minutos) (figura 3). La AUC del grupo de GLP-1 (7-36) amida fue 25165±4463 mg·min/dl, que es un valor disminuido en el 27,8% comparado con el grupo de solución salina (34864±4774 mg·min/dl). Sin embargo, [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido y N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido son 14470±5700 mg·min/dl y 17520±2484 mg·min/dl, respectivamente (es decir, disminuciones del 58,5% y el 49,7% cada uno). Estos resultados muestran que [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido y N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido tienen una actividad muy aumentada para inhibir el nivel de glucosa en sangre comparada con GLP-1 (7-36) amida.

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de GLP-1 de fórmula I o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo:



5

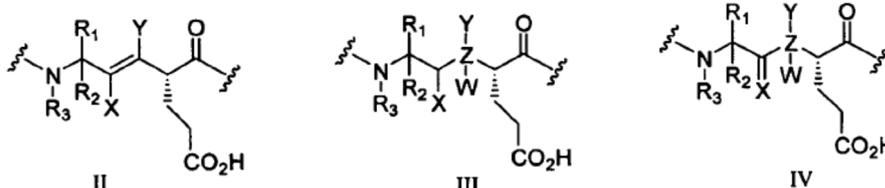
I

en donde:

10

Xaa₇ es L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, o α-metil-histidina;

Q es el enlazador II, III o IV:



15

en donde:

20

R₁ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), o alcoxi de (C₁-C₆),
 R₂ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆), o alcoxi de (C₁-C₆),
 R₃ es hidrógeno, alquilo de (C₁-C₆) o forma un anillo de 5-8 miembros con R₁ o R₂,
 X es hidrógeno, flúor, hidroxilo, trifluorometilo, u oxígeno,
 Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, o alquilo de (C₁-C₆),
 Z es nitrógeno, carbono, oxígeno, o azufre,
 W no existe cuando Z es nitrógeno, oxígeno, o azufre; W es hidrógeno o flúor cuando Z es carbono;

25

Xaa₁₄ es serina, o histidina; y uno o más átomos de carbono de Xaa₁₄ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

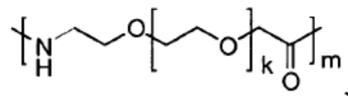
30

Xaa₁₆ es valina, lisina o leucina; y uno o más átomos de carbono de Xaa₁₆ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo; o

Xaa₁₆ es lisina unida con T-U, en donde,

35

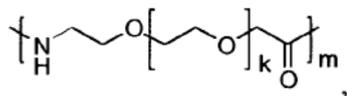
T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, HOOC(CH₂)_nCOOH, o



40

en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27; k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

U existe y es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos solo cuando T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico o



45

en donde k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

Xaa₁₈ es serina, arginina, o lisina; y uno o más de los átomos de carbono de Xaa₁₈ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo.

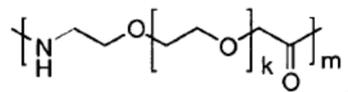
50

Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son cada uno independientemente glicina, Aib o ácido glutámico; y uno o más de los átomos de carbono de cada uno de Xaa₂₂ y Xaa₂₃ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo.

5 Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y Xaa₃₆ son cada uno independientemente glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina, o Aib (ácido α-aminoisobutírico); y uno o más de los átomos de carbono de cada uno de Xaa₂₆, Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y Xaa₃₆ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

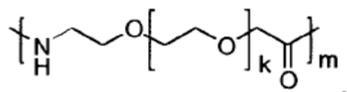
O Xaa₂₆ es lisina unida con T-U, en donde,

10 T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, HOOC(CH₂)_nCOOH, o



15 en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27; k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

U existe y es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos solo cuando T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico o

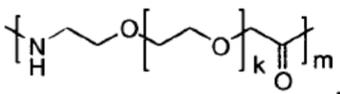


20 en donde k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

25 B es glicina, NH₂ u OH que representa la forma amida o ácido libre del aminoácido terminal, o

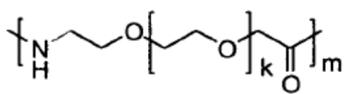
B es un segmento peptídico que consiste en cisteína y de uno a cuatro aminoácidos que es cada uno independientemente serina, glicina, alanina o monometoxipoliétilenglicol maleimida, cuando Xaa₂₆ es glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina, o Aib (ácido α-aminoisobutírico) y no está unido con T-U, en donde,

30 T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, HOOC(CH₂)_nCOOH, o



35 en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27; k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

U existe y es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos solo cuando T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico; o



40 en donde k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

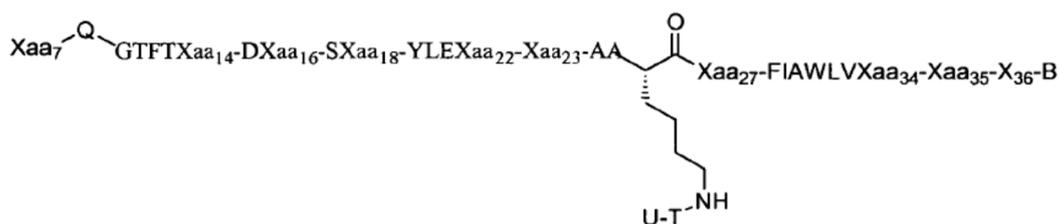
45 2. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 1, en donde Xaa₂₆ es glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina o Aib (ácido α-aminoisobutírico) y no está unido con T-U; B es cisteína-serina-glicina, cisteína-alanina, o cisteína-monometoxipoliétilenglicol maleimida.

3. Un análogo de GLP-1 según la reivindicación 1, en donde Q es el enlazador II e Y es hidrógeno.

50 4. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde Xaa₂₆ es glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina o Aib (ácido α-aminoisobutírico) y no está unido con T-U; B es cisteína-serina-glicina, cisteína-alanina, o cisteína-monometoxipoliétilenglicol maleimida.

55 5. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde X es hidrógeno, flúor o trifluorometilo.

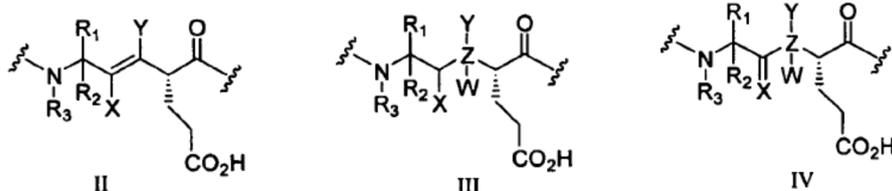
6. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde R_1 , R_2 y R_3 son cada uno independientemente hidrógeno o metilo.
7. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde R_1 , es metilo, R_2 y R_3 son cada uno independientemente hidrógeno.
8. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde R_1 y R_3 son cada uno independientemente hidrógeno, R_2 es metilo.
9. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 3, en donde R_3 forma un anillo de 5-8 miembros con R_1 y R_2 es hidrógeno; o R_3 forma un anillo de 5-8 miembros con R_2 y R_1 es hidrógeno.
10. Un análogo de GLP-1 según la reivindicación 1, en donde Q es el enlazador III, X es trifluorometilo y Z es nitrógeno.
11. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 10, en donde Xaa_{26} es glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina o Aib (ácido α -aminoisobutírico) y no está unido con T-U; B es cisteína-serina-glicina, cisteína-alanina, o cisteína-monometoxipoliétilenglicol maleimida.
12. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 10, en donde R_3 es hidrógeno.
13. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 10, en donde Y es hidrógeno o alquilo de (C_1 - C_6).
14. Un análogo de GLP-1 según la reivindicación 1, en donde Q es el enlazador IV, X es oxígeno y Z es carbono.
15. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 14, en donde Xaa_{26} es glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina o Aib (ácido α -aminoisobutírico) y no está unido con T-U; B es cisteína-serina-glicina, cisteína-alanina, o cisteína-monometoxipoliétilenglicol maleimida.
16. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 14, en donde R_3 es hidrógeno, o forma un anillo de 5-8 miembros con R_1 o R_2 .
17. El análogo de GLP-1 de la reivindicación 14, en donde Y es hidrógeno o flúor.
18. Un análogo de GLP-1 de fórmula VIII o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo:



VIII

Xaa_7 es L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina, o α -metil-histidina;

Q es el enlazador II, III o IV:



en donde:

R_1 es hidrógeno, alquilo de (C_1 - C_6) o alcoxi de (C_1 - C_6),
 R_2 es hidrógeno, alquilo de (C_1 - C_6), o alcoxi de (C_1 - C_6),
 R_3 es hidrógeno, alquilo de (C_1 - C_6) o forma un anillo de 5-8 miembros con R_1 o R_2 ,
X es hidrógeno, flúor, hidroxí, trifluorometilo, u oxígeno,
Y es hidrógeno, hidroxilo, flúor, o alquilo de (C_1 - C_6),

Z es nitrógeno, carbono, oxígeno, o azufre,

W no existe cuando Z es nitrógeno, oxígeno, o azufre; W es hidrógeno, o flúor cuando Z es carbono;

5 Xaa₇ es L-His, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, o α-metil-histidina;

Xaa₁₄ es serina, o histidina; y uno o más átomos de carbono de Xaa₁₄ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo

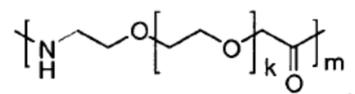
10 Xaa₁₆ es valina, lisina o leucina; y uno o más átomos de carbono de Xaa₁₆ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

15 Xaa₁₈ es serina, arginina, o lisina; y uno o más de los átomos de carbono de Xaa₁₈ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

Xaa₂₂ y Xaa₂₃ son cada uno independientemente glicina, Aib o ácido glutámico; y uno o más de los átomos de carbono de cada uno de Xaa₂₂ y Xaa₂₃ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

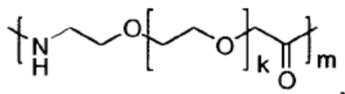
20 Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y Xaa₃₆ son cada uno independientemente glicina, lisina, arginina, leucina, asparragina, o Aib (ácido α-aminoisobutírico); y uno o más de los átomos de carbono de cada uno de Xaa₂₇, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y Xaa₃₆ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos alquilo;

T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, HOOC(CH₂)_nCOOH, o



en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27; k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

30 U existe y es un ácido graso con una longitud de 8 a 20 carbonos solo cuando T es ácido γ-glutámico, β-alanina, ácido γ-aminobutírico o



en donde k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

B es glicina, NH₂ u OH que respectivamente representa la forma amida o ácido libre del aminoácido terminal.

19. Un análogo de GLP-1 según la reivindicación 1, en donde:

40 B es Gly-Xaaⁿ-Xaaⁿ⁺¹-Xaaⁿ⁺²-Xaaⁿ⁺³-Xaaⁿ⁺⁴-Cys^(PEG)-Xaa^m-Xaa^{m+1}-Xaa^{m+2}-Xaa^{m+3}-Xaa^{m+4}

45 Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, y Xaaⁿ⁺⁴, todos juntos, no existen o son un segmento peptídico de uno, dos, tres o cuatro aminoácidos; y Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, y Xaa^{m+4}, todos juntos, no existen o son un segmento peptídico de uno, dos, tres o cuatro aminoácidos; siempre que el número total de aminoácidos proporcionados por todos de Xaaⁿ, Xaaⁿ⁺¹, Xaaⁿ⁺², Xaaⁿ⁺³, Xaaⁿ⁺⁴, Xaa^m, Xaa^{m+1}, Xaa^{m+2}, Xaa^{m+3}, y Xaa^{m+4} sea 1, 2, 3, o 4, y la cisteína esté unida a monometoxipolietilenglicol maleimida.

20. Un análogo de GLP-1, que es

50 [enlazador Q-d8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido;
 [enlazador Q-a8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido;
 [enlazador Q-b8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido;
 [enlazador Q-c8, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido;
 55 [enlazador Q-e8-9, Glu22]GLP-1-(7-37)-péptido;
 [enlazador Q-f8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-d8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-e8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 60 N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-f8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-ε²⁶-[γ-L-glutamil(N-α-hexadecanoil)]-[enlazador Q-a8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;

N- ϵ ²⁶-[γ -L-glutamil(N- α -hexadecanoil)]-[enlazador Q-b8-9,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-²⁶-[(N ϵ - ω -carboxiheptadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 N-²⁶-[(N ϵ - ω -carboxinonadecanoil)]-[enlazador Q-c8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido;
 5 [enlazador Q-d8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 [enlazador Q-c8]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 [enlazador Q-a8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 [enlazador Q-b8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂;
 [enlazador Q-e8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂; o
 10 [enlazador Q-f8-9]GLP-1-(7-37)-Cys^(PEG)-Ala-NH₂.

21. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de GLP-1 según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
22. La composición farmacéutica según la reivindicación 21, en donde la composición farmacéutica es adecuada para la administración parenteral.
23. Un análogo de GLP-1 según cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para su uso como un medicamento.
24. Uso de un análogo de GLP-1 según cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia a glucosa alterada, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares, ictus, síndrome del intestino inflamatorio, dispepsia o úlceras gástricas.
25. Uso de un análogo de GLP-1 según la reivindicación 24 para la producción de un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en diabetes de tipo 2.