

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 287**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

**A61P 5/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10737252 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2454282**

54 Título: **Análogos de glucagón acilados**

30 Prioridad:

**13.07.2009 EP 09251780**

**13.07.2009 US 225080 P**

**22.03.2010 EP 10157240**

**10.05.2010 DK 201000412**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

**ZEALAND PHARMA A/S (100.0%)**

**Smedeland 36**

**2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es:

**RIBER, DITTE;**

**MEIER, EDDI;**

**DAUGAARD, JENS, ROSENGREN;**

**SKOVGAARD, MARIE;**

**TOLBORG, JAKOB, LIND;**

**KAMPEN, GITA y**

**BÆK, CAMILLA, ÆRTEBERG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 537 287 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

Análogos de glucagón acilados

5 **Campo de la invención**

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

10 **Antecedentes de la invención**

La obesidad y la diabetes son problemas de salud que están aumentando globalmente y que están asociados con diversas enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares (ECV), apnea del sueño obstructiva, ictus, cardiopatía periférica, complicaciones microvasculares y osteoartritis.

15 En todo el mundo hay 246 millones de personas con diabetes, y en el año 2025 se calcula que unos 380 millones tendrán diabetes. Muchas tienen factores de riesgo cardiovasculares adicionales incluyendo niveles de LDL y triglicéridos altos/aberrantes y de HDL bajos.

20 Las enfermedades cardiovasculares representan aproximadamente el 50 % de la mortalidad en personas con diabetes y las tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas con la obesidad y la diabetes ponen de manifiesto la necesidad médica de opciones de tratamiento eficaces.

25 El proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa diferencialmente en los tejidos para formar diversos péptidos estructuralmente relacionados derivados del proglucagón, incluyendo glucagón (Glu), péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). Estas moléculas están implicadas en una amplia serie de funciones fisiológicas, incluyendo, homeostasis de la glucosa, secreción de insulina, vaciado gástrico y desarrollo intestinal, así como en la regulación de la ingesta de alimentos.

30 El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del pre-proglucagón y tiene la secuencia His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr. La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia completa de 29 aminoácidos del glucagón con una extensión octapeptídica carboxilo terminal (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón, que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala y que se denomina "péptido interviniente 1" o PI-1; la secuencia completa de la oxintomodulina humana es por tanto His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala). El fragmento principal biológicamente activo del GLP-1 se produce como un péptido amidado en el extremo C, de 30 aminoácidos, que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del pre-proglucagón.

40 El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucemia uniéndose a los receptores de glucagón en los hepatocitos, haciendo que el hígado libere glucosa almacenada en forma de glucógeno a través de una glicogenólisis. A medida que estas reservas comienzan a agotarse, el glucagón estimula al hígado para sintetizar glucosa adicional por gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en la corriente sanguínea, impidiendo el desarrollo de hipoglucemia. Adicionalmente, se ha demostrado que el glucagón aumenta la lipólisis y disminuye el peso corporal.

45 El GLP-1 disminuye los niveles de glucemia elevados mejorando la secreción de insulina estimulada por glucosa y promueve principalmente la pérdida de peso disminuyendo la ingesta de alimento.

50 La Oxintomodulina se libera en la sangre en respuesta a la ingesta de alimento y en relación al contenido calórico de las comidas. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no se conoce bien. En particular, no se sabe si los efectos de la hormona están exclusivamente mediados a través del receptor del glucagón y el receptor del GLP-1, o a través de uno o más receptores aún no identificados.

55 Se ha demostrado que otros péptidos se unen y activan tanto al receptor del glucagón como al del GLP-1 (Hjort *et al*, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimento (documentos WO 2006/134340; WO 2007/100535; WO 2008/101017, WO 2008/152403, WO 2009/155257 y WO 2009/155258). Se ha demostrado que la estabilización de péptidos proporciona un mejor perfil farmacocinético para diversos fármacos. En particular se ha demostrado que la adición de uno o más grupos de polietilenglicol (PEG) o acilo prolonga la semivida de péptidos tales como GLP-1 y de otros péptidos con corta estabilidad plasmática.

60 En los documentos WO 00/55184A1 y WO 00/55119 se desvelan métodos para la acilación de diversos péptidos, en particular GLP-1. Madsen *et al* (J. Med. Chem. 2007, 50, 6126-6132) describen el GLP-1 acilado en la posición 20 (Liraglutida) y proporcionan datos sobre su estabilidad.

65

En los documentos WO2007/100535, WO08/071972 y en *Endocrinology* 2009, 150(4), 1712-1721 de Druce, M R *et al.* también se ha demostrado que la estabilización de la OXM por PEGilación y acilación C terminal mejora el perfil farmacocinético de análogos seleccionados.

- 5 Recientemente se ha observado que la PEGilación de análogos de glucagón tiene un efecto significativo sobre el perfil farmacocinético de los compuestos ensayados (documento WO2008/101017) aunque también interfiere con la fuerza de estos compuestos.

### Sumario de la invención

- 10 La invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



- 15 en la que R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-4</sub>, acetilo, formilo, benzilo o trifluoroacetilo;  
R<sup>2</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
y Z es un péptido que tiene la fórmula I;

- 20 His-X2-Gtn-Giy-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-X16-X17-Ala-Ala-X20-X21-  
Phe-Val-X24-Trp-Leu-X27-X28-Ala-X30; (I)

en la que

- 25 X2 se selecciona de Aib o Ser;  
X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;  
X16 se selecciona de Arg y X;  
X17 se selecciona de Arg y X;  
X20 se selecciona de Arg, His y X;  
30 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
X24 se selecciona de Ala y X;  
X27 se selecciona de Leu y X;  
X28 se selecciona de Arg y X;  
X30 es X o no está ausente;  
en la que al menos uno de X16, X17, X20, X24, X27, X28 y X30 es X;  
35 y en la que cada resto X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, Ser, Cys, Dbu, Dpr y Orn

en la que la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

- 40 (i) Z<sup>1</sup>, en la que Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
(ii) Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>, en la que Z<sup>1</sup> un residuo lipófilo, Z<sup>2</sup> es un espaciador y Z<sup>1</sup> se conjuga con la cadena lateral de X mediante Z<sup>2</sup>;

- 45 con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDK(Hexadecanoil-γ-Glu)-AAHDFVEWLLRA.

X30 puede estar presente o ausente. En aquellas realizaciones en las que X está presente, puede ser deseable que este sea Lys.

- 50 En determinadas realizaciones, cualquier resto X, y especialmente cualquier resto X que esté conjugado con un sustituyente lipófilo, se selecciona independientemente de Lys, Glu o Cys.

En determinadas realizaciones,

- 55 X16 se selecciona de Glu, Lys y Ser;  
X17 se selecciona de Lys y Cys;  
X20 se selecciona de His, Lys, Arg y Cys;  
X24 se selecciona de Lys, Glu y Ala;  
X27 se selecciona de Leu y Lys; y/o  
X28 se selecciona de Ser, Arg y Lys.

- 60 Como combinaciones específicas de restos que pueden estar presentes en el péptido de fórmula I se incluyen las siguientes:

- 65 X2 es Aib y X17 es Lys;  
X2 es Aib y X17 es Cys;  
X2 es Aib y X20 es Cys;  
X2 es Aib y X28 es Lys;

5 X12 es Arg y X17 es Lys;  
 X12 es Leu y X17 es Lys;  
 X12 es Lys y X20 es Lys;  
 X12 es Lys y X17 es Lys;  
 X16 es Lys y X17 es Lys;  
 X16 es Ser y X17 es Lys;  
 X17 es Lys y X20 es Lys;  
 X17 es Lys y X21 es Asp;  
 10 X17 es Lys y X24 es Glu;  
 X17 es Lys y X27 es Leu;  
 X17 es Lys y X27 es Lys;  
 X17 es Lys y X28 es Ser;  
 X17 es Lys y X28 es Arg;  
 X20 es Lys y X27 es Leu;  
 15 X21 es Asp y X27 es Leu;  
 X2 es Aib, X12 es Lys y X16 es Ser;  
 X12 es Lys, X17 es Lys y X16 es Ser;  
 X12 es Arg, X17 es Lys y X16 es Glu;  
 X16 es Glu, X17 es Lys y X20 es Lys;  
 20 X16 es Ser, X21 es Asp y X24 es Glu;  
 X17 es Lys, X24 es Glu y X28 es Arg;  
 X17 es Lys, X24 es Glu y X28 es Lys;  
 X17 es Lys, X27 es Leu y X28 es Ser;  
 X17 es Lys, X27 es Leu y X28 es Arg;  
 25 X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu;  
 X20 es Lys, X27 es Leu y X28 es Ser;  
 X20 es Lys, X27 es Leu y X28 es Arg;  
 X16 es Ser, X20 es His, X24 es Glu y X27 es Leu;  
 X17 es Lys, X20 es His, X24 es Glu y X28 es Ser;  
 30 X17 es Lys, X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu; o  
 X17 es Cys, X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu.

35 Puede ser deseable que el péptido de fórmula I contenga solo un aminoácido del tipo del cual está derivatizado por la adición del sustituyente lipófilo. Por ejemplo, el péptido puede contener solo un resto de Lys, solo un resto de Cys o solo un resto de Glu para que el sustituyente lipófilo se conjugue con ese resto.

40 Los compuestos de la invención pueden llevar uno o más puentes intramoleculares en la secuencia peptídica de fórmula I. Cada uno de dichos puentes se forma entre las cadenas laterales de dos restos de aminoácidos de fórmula I que están normalmente separados por tres aminoácidos en una secuencia de aminoácidos lineal (es decir entre el aminoácido A y el aminoácido A+4).

45 Más particularmente, el puente puede formarse entre las cadenas laterales de los pares de restos 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24 o 24 y 28. Las dos cadenas laterales pueden unirse entre sí a través de interacciones iónicas o por enlaces covalentes. Por tanto estos pares de restos pueden comprender cadenas laterales con carga opuesta para formar un puente salino mediante interacciones iónicas. Por ejemplo, uno de los restos puede ser Glu o Asp, mientras que el otro puede ser Lys o Arg. Los emparejamientos de Lys y Glu y de Lys y Asp también pueden reaccionar para formar un anillo de lactama.

50 Los ejemplos de pares de restos adecuados en las posiciones 16 y 20 incluyen:

X16 es Glu y X20 es Lys;  
 X16 es Glu y X20 es Arg;  
 X16 es Lys y X20 es Glu; y  
 X16 es Arg y X20 es Glu.

55 Los ejemplos de pares de restos adecuados en las posiciones 17 y 21 incluyen:

60 X17 es Arg y X21 es Glu;  
 X17 es Lys y X21 es Glu;  
 X17 es Arg y X21 es Asp; y  
 X17 es Lys y X21 es Asp.

Los ejemplos de pares de restos adecuados en las posiciones 20 y 24 incluyen:

65 X20 es Glu y X24 es Lys;  
 X20 es Glu y X24 es Arg;

X20 es Lys y X24 es Glu; y  
X20 es Arg y X24 es Glu.

Los ejemplos de pares de restos adecuados en las posiciones 24 y 28 incluyen:

X24 es Glu y X28 es Lys;  
X24 es Glu y X28 es Arg;  
X24 es Lys y X28 es Glu; y  
X24 es Arg y X28 es Glu.

El emparejamiento de Lys y Glu, por ejemplo, para formar un anillo de lactama, puede ser particularmente deseable, especialmente entre las posiciones 24 y 28.

Será obvio que un resto implicado en un puente intramolecular tampoco puede derivatizarse con un sustituyente lipófilo. Por tanto, cuando un resto X está implicado en un puente intramolecular, al menos uno de los otros restos X está conjugado con uno o más sustituyentes lipófilos.

Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, se piensa que dichos puentes intramoleculares estabilizan la estructura alfa helicoidal de la molécula y de este modo aumentan la fuerza y/o selectividad en el receptor de GLP-1 y posiblemente también en el receptor de glucagón.

El compuesto puede tener la fórmula:



en la que R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-4</sub>, acetilo, formilo, benzilo o trifluoroacetilo;  
R<sup>2</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
y Z es un péptido que tiene la fórmula IIa;

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-X16-X17-Ala-Ala-X20-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
Leu-Leu-X28-Ala; (IIa).

en la que

X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;  
X16 se selecciona de Ser y X;  
X17 es X;  
X20 se selecciona de His y X;  
X21 se selecciona de Asp y Glu;  
X24 se selecciona de Ala y Glu;  
X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;  
y en la que cada uno de los restos X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, y Cys;

en la que la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i) Z<sup>1</sup>, en la que Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
(ii) Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>, en la que Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo, Z<sup>2</sup> es un espaciador y Z<sup>1</sup> está conjugado con la cadena lateral de X mediante Z<sup>2</sup>.

Como alternativa, el compuesto puede tener la fórmula:



en la que R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-4</sub>, acetilo, formilo, benzilo o trifluoroacetilo;  
R<sup>2</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
y Z es un péptido que tiene la fórmula IIb;

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-X16-X17-Ala-Ala-X20-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
Leu-Leu-X28-Ala; (IIb)

en la que

X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;  
X16 se selecciona de Ser y X;  
X17 es X;

X20 se selecciona de His y X;  
 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
 X24 se selecciona de Ala y Glu;  
 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

5 y en la que cada resto X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, y Cys;

en la que la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

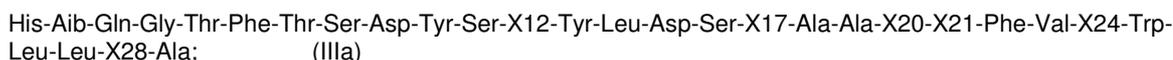
- 10 (i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
 (ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  se conjuga con la cadena lateral de X mediante  $Z^2$ .

con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA.

15 El compuesto puede tener la fórmula:



20 en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
 $R^2$  es OH o  $NH_2$ ;  
 y Z es un péptido que tiene la fórmula IIIa;



25 en la que

30 X12 se selecciona de Lys y Arg;  
 X17 es X;  
 X20 se selecciona de His y X;  
 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
 X24 se selecciona de Ala y Glu;  
 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;  
 35 y en la que cada resto X se selecciona independientemente de Glu, Lys y Cys;

en la que la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

- 40 (i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
 (ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  se conjuga con la cadena lateral de X mediante  $Z^2$ .

Como alternativa el compuesto puede tener la fórmula:



45 en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
 $R^2$  es OH o  $NH_2$ ;  
 y Z es un péptido que tiene la fórmula IIIb;

50 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-Ser-X17-Ala-Ala-X20-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
 Leu-Leu-X28-Ala; (IIIb)

en la que

55 X12 se selecciona de Lys o Arg;  
 X17 es X;  
 X20 se selecciona de His y X;  
 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
 X24 se selecciona de Ala y Glu;  
 60 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;  
 y en la que cada resto X se selecciona independientemente de Glu, Lys y Cys;

en la que la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

- 65 (i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
 (ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  está conjugado con la cadena lateral de X

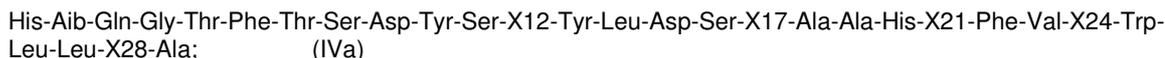
mediante  $Z^2$ .

con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu))-AAHDFVEWLLRA.

5 El compuesto puede tener la fórmula:



10 en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
 $R^2$  es OH o  $NH_2$ ;  
 y Z es un péptido que tiene la fórmula IVa;



15 en la que

20 X12 se selecciona de Lys y Arg;  
 X17 es X;  
 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
 X24 se selecciona de Ala y Glu;  
 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

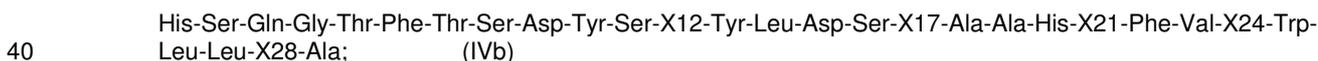
25 en la que X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;  
 y en la que la cadena lateral de X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

30 (i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
 (ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  se conjuga con la cadena lateral de X  
 mediante  $Z^2$ .

Como alternativa el compuesto puede tener la fórmula:



35 en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
 $R^2$  es OH o  $NH_2$ ;  
 y Z es un péptido que tiene la fórmula IVb;



en la que

45 X12 se selecciona de Lys y Arg;  
 X17 es X;  
 X21 se selecciona de Asp y Glu;  
 X24 se selecciona de Ala y Glu;  
 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;  
 50 en el que X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;

y en el que la cadena lateral de X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

55 (i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
 (ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  se conjuga con la cadena lateral de X  
 mediante  $Z^2$ .

con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu))-AAHDFVEWLLRA.

Como alternativa el compuesto puede tener la fórmula:



65 en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
 $R^2$  es OH o  $NH_2$ ;  
 y Z es un péptido que tiene la fórmula V

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Ala-Ala-His-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-  
Leu-Leu-X28; (V)

en la que

5

X28 es Ser o no está ausente;

X17 es X

en la que X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;

10 y en la que la cadena lateral de X está conjugada con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i)  $Z^1$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o

(ii)  $Z^1Z^2$ , en la que  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  se conjuga con la cadena lateral de X mediante  $Z^2$ .

15

En determinadas realizaciones de la invención, el péptido de fórmula I puede tener la secuencia:

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDKKAHDFVEWLLRA;  
 20 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLKRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLKA;  
 HSQGTFTSDYSRYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSLYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 25 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRAK;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSAK  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLKSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVKWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSCAAHDFVEWLLRA;  
 30 HSQGTFTSDYSKYLDSCAAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAACDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDKSAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSAK;  
 35 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLKA  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVAWLLSA  
 40 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVAWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDKKAHDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSRYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVKWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSLYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 45 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSCAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAACDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()KAAE()DFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVE()WLLK()A  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAK()DFVE()WLLRA;  
 50 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK()AAHE()FVEWLLKA; o  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKQAAKE()FVEWLLRA.

En determinadas realizaciones estos péptidos pueden llevar a un sustituyente lipófilo en las siguientes posiciones  
 marcadas con "\*":

55

HSQGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLD-K\*-KAAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K\*-RA;

60

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K\*-A;

HSQGTFTSDYSRYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSLYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA-K\*;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA-K\*;

65

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K\*-SA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K\*-WLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-C\*-DFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLD-K\*-SAAHDFVEWLLRA;  
 5 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA-K\*;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AARDFVAVLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVAVLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K\*-A;  
 10 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVAVLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVAVLL-K\*-A;  
 15 H-Aib-G1GTFTSDYSKYLD-K\*-KAAHDFVAVLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSRYLDS-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K\*-WLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSLYLD-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-C\*-DFVEWLLRA;  
 20 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-S\*-KAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()K\*AAE()DFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK\*AAHDFVE()WLLK()A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK\*AAK()DFVE()WLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()AAHE()FVEWLLK\*A; o  
 25 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()AAK\*E()FVEWLLRA.

Los restos marcados con “()” participan en un enlace intramolecular, tal como un anillo de lactama. La cadena (o cadenas) lateral de uno o más de los restos X está conjugada con un sustituyente lipófilo. Por ejemplo, una cadena lateral de un resto X puede conjugarse con un sustituyente lipófilo. Como alternativa, dos, o incluso más de dos, cadenas laterales de restos X pueden conjugarse con un sustituyente lipófilo.

Por ejemplo, al menos uno de X16, X17, X20 y X28 puede conjugarse con un sustituyente lipófilo. En dichos casos, X30 puede estar ausente. Cuando X30 está presente, está normalmente conjugado con un sustituyente lipófilo.

Por tanto el compuesto puede tener tan solo un solo sustituyente lipófilo, en la posición 16, 17, 20, 24, 27, 28 o 30, preferentemente en la posición 16, 17 o 20, particularmente en la posición 17.

Como alternativa, el compuesto puede tener exactamente dos sustituyentes lipófilos, cada uno en las posiciones 16, 17, 20, 24, 27, 28 o 30. Preferentemente uno o ambos sustituyentes lipófilos están presentes en una de las posiciones 16, 17 o 20.

Por tanto, el compuesto puede tener sustituyentes lipófilos en las posiciones 16 y 17, 16 y 20, 16 y 24, 16 y 27, 16 y 28 o 16 y 30; en las posiciones 17 y 20, 17 y 24, 17 y 27, 17 y 28 o 17 y 30; en las posiciones 20 y 24, 20 y 27, 20 y 28 o 20 y 30; en las posiciones 24 y 27, 24 y 28 o 24 y 30; en las posiciones 27 y 28 o 27 y 30; o en las posiciones 28 y 30.

En otras realizaciones adicionales, el compuesto puede tener uno o más sustituyentes lipófilos adicionales (proporcionando tres o más en total) en posiciones adicionales seleccionadas de las posiciones 16, 17, 20, 24, 27, 28 o 30. Sin embargo puede ser deseable que un máximo de dos posiciones se derivaticen de esta manera.

$Z^1$  puede comprender una cadena hidrocarbonada que tenga de 10 a 24 átomos de C, por ejemplo de 10 a 22 átomos de C, por ejemplo de 10 a 20 átomos de C. Puede tener al menos 11 átomos de C y/o 18 átomos de C o menos. Por ejemplo, la cadena hidrocarbonada puede contener 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 átomos de carbono. Por tanto  $Z^1$  pueden ser un residuo de dodecanoilo, 2-butiloctanoilo, tetradecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo o eicosanoilo.

Independientemente, cuando  $Z^2$  está presente, puede ser, o comprender, uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo,  $Z^2$  puede ser un resto de  $\gamma$ -Glu, Glu,  $\beta$ -Ala o  $\epsilon$ -Lys, o un residuo de 4-aminobutanoilo, 8-aminooctanoilo y 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo. Determinadas combinaciones de  $Z^1$  y  $Z^2$  son Dodecanoil- $\gamma$ -Glu, Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu, Hexadecanoil-Glu, Hexadecanoil-[3-aminopropanoilo], Hexadecanoil-[8-aminooctanoilo], Hexadecanoil- $\epsilon$ -Lys, 2-butiloctanoil- $\gamma$ -Glu, Octadecanoil- $\gamma$ -Glu y Hexadecanoil-[4-aminobutanoilo].

En realizaciones particulares, Z tiene la fórmula:

65

HSQGTFTSDYSKYLD-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-KAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-RA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-DFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-A;  
 5 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVE()WLLK()A;  
 10 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLKA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-DFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(dodecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[3-aminopropanoil])-AAHDFVEWLLSA;  
 15 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[8-aminooctanoil])-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\epsilon$ -Lys)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K([2-butiloctanoil]- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 20 HS4GTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[4-aminobutanoil])-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 25 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([2-butiloctanoil]-  $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[4-aminobutanoil])-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA; o  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA.  
 Los restos marcados con “()” participan en un enlace intramolecular, tal como un anillo de lactama.

30 En una realización adicional, Z tiene la fórmula:

H-Aib-QGTFTSDYS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-YLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K(Hexadecanoil-isoGlu)-KAAHDFVEWLLSA;  
 35 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil-isoGlu)-DFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K(Hexadecanoil-isoGlu)-WLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoLys)-AARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA;  
 40 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHEFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAEDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLEA.

45 En un aspecto adicional, Z tiene la fórmula:

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLS;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLL;

50 En otro aspecto adicional, Z tiene la fórmula:

H-Aib-EGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA;

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto, como se define en el presente documento, o una sal o derivado del mismo, en mezcla con un vehículo. En realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. La sal puede ser una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable del compuesto, por ejemplo, una sal de acetato o de cloruro.

60 Los compuestos descritos encuentran uso previniendo el aumento de peso o promoviendo la pérdida de peso. El término “prevención” significa inhibir o reducir el aumento de peso cuando se compara con la ausencia de tratamiento, y no significa necesariamente que implique el cese completo del aumento de peso. Los péptidos pueden producir una disminución en la ingesta de alimento y/o un aumento del gasto energético, dando como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal, los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre los niveles de glucosa en la circulación, sobre la tolerancia a la glucosa y/o sobre los niveles de colesterol en la circulación, pudiendo disminuir los niveles de LDL en la

65

circulación y aumentar la relación HDL/LDL. Por tanto los compuestos de la invención pueden usarse para terapia directa o indirecta de cualquier afección ocasionada o caracterizada por sobrepeso, tal como para el tratamiento y/o la prevención de obesidad, obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedades de la vesícula biliar relacionadas con la obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad. También pueden usarse para el tratamiento de prediabetes, resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, hipertensión o dislipidemia aterogénica (o una combinación de dos o más de estos factores de riesgo metabólicos), aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria periférica, ictus y enfermedad microvascular. Sus efectos en estas afecciones pueden ser un resultado de, o estar asociados con, sus efectos sobre el peso corporal, o pueden ser independientes de los mismos.

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

La invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

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

En dichos casos, los dos agentes activos pueden proporcionarse juntos o por separado, y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones distintas.

Por tanto el compuesto de la invención (o la sal del mismo) puede usarse en combinación con un agente antidiabético, incluyendo pero sin limitación, metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona, o insulina. En una realización preferida el compuesto o la sal del mismo se usan en combinación con insulina, un inhibidor de DPP-IV, sulfonilurea o metformina, particularmente sulfonilurea o metformina, para conseguir un control glucémico adecuado. En una realización incluso más preferida el compuesto o la sal del mismo se usan en combinación con una metformina, una sulfonilurea, insulina o un análogo de insulina para conseguir un control glucémico adecuado. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero sin limitación, Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix, Actraphane HM, Levemir y Apidra.

El compuesto o la sal del mismo pueden usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad, incluyendo pero sin limitación, un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón, el péptido YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor canabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina o un antagonista del receptor de la hormona concentradora de melanina 1.

El compuesto o la sal del mismo pueden usarse adicionalmente en combinación con un agente antihipertensión, incluyendo pero sin limitación, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de angiotensina II, diuréticos, un beta bloqueante o un bloqueante de los canales de calcio.

El compuesto o la sal del mismo pueden usarse en combinación con un agente anti-dislipidemia, incluyendo pero sin limitación, una estatina, un fibrato, una niacina, o un inhibidor de la absorción de colesterol.

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Perfil farmacocinético del compuesto 13 después de la administración subcutánea (s.c.) a ratones a una dosis de 100 nmol/kg.

**Figura 2.** Efecto de la administración s.c. del compuesto 11 (10 nmol/kg) durante 21 días sobre la tolerancia a glucosa oral en ratones C57BL/6J con dieta prolongada rica en grasa. Los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

**Figura 3.** Durante 4 semanas se trataron ratones diabéticos (db/db) con vehículo o con el compuesto 7 (12,7 nmol/kg) y se determinó la HbA1c (Cobas®, norma de aplicación: A1C-2) en muestras de sangre entera (20  $\mu$ l) extraídas de los ratones tratados. La  $\Delta$ HbA1c (%) se calculó para cada ratón restando su HbA1c (%) al inicio del tratamiento de la HbA1c (%) a las 4 semanas. La  $\Delta$ HbA1c (%) de los ratones db/db tratados durante 4 semanas con vehículo = 100 %. \* (P = 0,03, ensayo de la t de Student).

**Figura 4.** Efecto de la administración s.c. durante 21 días del compuesto 11 sobre el peso corporal en ratones C57BL/6J con dieta prolongada rica en grasa. Los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

**Figura 5.** Durante 4 semanas se trataron ratones con Obesidad Inducida por la dieta (OID) con vehículo o con el compuesto 7 (12,7 nmol/kg) y se preparó plasma de las muestras de sangre extraídas. Se determinó el colesterol total en cada muestra de plasma (Cobas®; norma de aplicación CHOL2). \*\*\* (P < 0,0001, ensayo de la t de Student). Los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

**Figura 6.** Se trataron ratones con Obesidad Inducida por la dieta (OID) con vehículo o con el compuesto 7 (12,7 nmol/kg) y se preparó plasma de las muestras de sangre extraídas. Se determinó el colesterol LDL y HDL en cada muestra de plasma (Cobas®; normas de aplicación HDLC3 y LDL\_C). \*\*\* (P < 0,0001, ensayo t de Student). Los datos se muestran como media ± ETM.

**Figura 7.** Efecto de la administración s.c. de agonistas de GluGLP-1 sobre el aumento de peso corporal en ratones C57BL/6J con dieta rica en grasa. Los datos son media ± ETM. Línea Negra: Vehículo (PBS), línea Gris: dosis baja (0,5 nmol/kg), línea discontinua: dosis alta (5 nmol/kg).

**Figura 8.** Efecto de la administración s.c. aguda del Compuesto 7 sobre la tolerancia a glucosa oral 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h después de la dosificación en ratones C57BL/6J con una dieta rica en grasa. Los datos se expresan como media ± ETM.

**Figura 9.** Efecto de la administración s.c. del Compuesto 7 y exendina-4 sobre la ingesta de alimento/peso corporal en ratones C57BL/6J delgados jóvenes. Los datos son la media ± ETM. \* $p < 0,05$  frente a vehículo en delgados jóvenes. Los datos se expresan como media + ETM.

**Figura 10.** Efecto de la administración s.c. del Compuesto 7 y exendina-4 sobre la ingesta de alimento acumulativa/peso corporal en ratones C57BL/6J obesos mayores. Los datos son la media + ETM. \* $p < 0,05$  frente a vehículo en obesos mayores. Los datos se expresan como media + ETM.

**Figura 11.** Efecto de la administración s.c. de Vehículo, exendina-4 (10 nmol/kg) y Compuesto 11 (10 nmol/kg) sobre la concentración de lípidos en plasma en ratones C57BL/6J obesos mayores. Los datos son la media + ETM.

**Figura 12.** Durante 2 semanas se trataron ratones dos veces al día por vía s.c. con el Compuesto 1 y el Compuesto 11 (a dos dosis: 0,5 y 5 nmol/kg) o con vehículo. El día del sacrificio, se expuso el hígado y se pesó. El Compuesto 1 aumentó significativamente la "proporción de peso hepático/peso corporal" a la dosis alta. El Compuesto 11 no afectó a la "proporción de peso hepático/peso corporal" a las dos dosis (0,5 y 5 nmol/kg). El Compuesto 1 es un agonista doble de GluGLP-1 no acilado y el Compuesto 11 es un agonista doble de GluGLP-1 de acción prolongada (Figura 12).

**Figura 13.** Durante 4 semanas se trataron ratones diabéticos (db/db) con vehículo o con compuesto 11 (12,7 nmol/kg) y se determinó la HbA1c (Cobas®, norma de aplicación: A1C-2) en muestras de sangre entera (20  $\mu$ l) extraídas de los ratones tratados. La  $\Delta$ HbA1c (%) se calculó para cada ratón restando su HbA1c (%) al inicio del tratamiento de HbA1c (%) a las 4 semanas.  $\Delta$ HbA1c (%) de ratones db/db tratados durante 4 semanas con vehículo = 100 %. \* (P = 0,03, ensayo de la t de Student).

#### Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva, se usan los códigos convencionales de una y tres letras de los aminoácidos de origen natural, así como los códigos de tres letras generalmente aceptados de otros aminoácidos, incluyendo Aib (ácido  $\alpha$ - aminoisobutírico), Orn (ornitina), Dbu (ácido 2,4 diaminobutírico) y Dpr (ácido 2,3- diaminopropanoico).

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

La secuencia peptídica del compuesto de la invención se diferencia de la del glucagón nativo al menos en las posiciones 18, 20, 24, 27, 28 y 29. Además, puede diferenciarse de la del glucagón nativo en una o más de las posiciones 12, 16 y 17.

El glucagón nativo tiene Arg en la posición 18. El compuesto de la invención tiene el pequeño resto hidrófobo Ala en la posición 18 que se piensa que incrementa la fuerza de los receptores tanto del glucagón como del GLP-1 pero particularmente la del receptor del GLP-1.

Los restos en las posiciones 27, 28 y 29 del glucagón nativo parecen proporcionar selectividad significativa para el receptor de glucagón. Las sustituciones en estas posiciones con respecto a la secuencia del glucagón nativo, particularmente la Ala en la posición 29, pueden aumentar la fuerza y/o la selectividad para el receptor de GLP-1, posiblemente sin reducción significativa de fuerza en el receptor de glucagón. Como ejemplos adicionales que pueden incluirse en los compuestos de la invención se incluyen Leu en la posición 27 y Arg en la posición 28. Arg en la posición 28 puede ser particularmente preferido cuando hay una Glu en la posición 24 con la que puede formar un puente intramolecular, dado que esto puede aumentar su efecto sobre la fuerza en el receptor de GLP-1.

La sustitución del resto Met de origen natural en la posición 27 (por ejemplo con Leu, Lys o Glu) también reduce la posibilidad de oxidación, aumentando así la estabilidad química de los compuestos.

La sustitución del resto Asn de origen natural en la posición 28 (por ejemplo por Arg, o Ser) también reduce la posibilidad de desamidación en solución ácida, aumentando de este modo la estabilidad química de los compuestos.

La fuerza y/o la selectividad en el receptor de GLP-1, posiblemente sin pérdida significativa de fuerza en el receptor de glucagón, también pueden aumentarse introduciendo restos que probablemente estabilizan una estructura alfa helicoidal, en la parte C-terminal del péptido. Puede ser deseable, pero se piensa que no esencial, que esta parte helicoidal de la molécula tenga un carácter anfipático. La introducción de restos tales como Leu en la posición 12 y/o Ala en la posición 24 puede ayudar. De manera adicional o como alternativa pueden introducirse restos cargados en una o más de las posiciones 16, 20, 24 y 28. Por tanto, todos los restos de las posiciones 24 y 28, pueden estar cargados, todos los restos de las posiciones 20, 24 y 28 pueden estar cargados o todos los restos de las posiciones 16, 20, 24 y 28 pueden estar cargados. Por ejemplo, el resto en la posición 20 puede ser His o Arg, particularmente His. El resto en la posición 24 puede ser Glu, Lys o Arg, particularmente Glu. El resto en la posición 28 puede ser Arg. La introducción de un puente intramolecular en esta parte de la molécula, como se indicó anteriormente, también puede contribuir a estabilizar el carácter helicoidal, por ejemplo, entre las posiciones 24 y 28.

La sustitución de uno o dos de los restos de Gln de origen natural en las posiciones 20 y 24 también reduce la posibilidad de desamidación en solución ácida, aumentando así la estabilidad química de los compuestos.

Una sustitución relativa a la secuencia de glucagón nativo en la posición 12 (es decir de Arg o Leu) puede aumentar la fuerza en ambos receptores y/o la selectividad en el receptor de GLP-1.

El truncamiento C terminal de los péptidos no reduce la fuerza de ninguno de los receptores y/o la selectividad del receptor de GLP-1. En particular, el truncamiento de la posición 29 o el truncamiento de ambas posiciones, 28 y 29, no reduce la fuerza del receptor en ninguno de los dos receptores.

La cadena lateral de uno o más de los restos designados con X (es decir, las posiciones 16, 17, 20, 24, 27 y 28 y/o 30 si está presente) se conjuga con un sustituyente lipófilo. Se apreciará que la conjugación del sustituyente lipófilo con una cadena lateral particular puede influir (por ejemplo reducir) en algunos de los beneficios con los que la cadena lateral no conjugada puede proporcionarse en esa posición. Los inventores han descubierto que los compuestos de la invención proporcionan un equilibrio entre los beneficios de la acilación y los beneficios de sustituciones particulares relativas a la secuencia de glucagón nativo.

Las composiciones de la invención pueden adicionalmente formar compuestos en, o unirse a, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electroestáticas, un vehículo farmacológico, un sistema de suministro de fármacos y un sistema de suministro de fármacos avanzado, para potenciar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir una cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica y aumentar el cumplimiento por parte del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, de sistemas de suministro de fármacos y de sistemas de suministro de fármacos avanzado incluyen, pero sin limitación, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas transportadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas de copolímeros en bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de las mismas, bien conocidas por los expertos en la técnica del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsiones, automicroemulsiones, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.

Otros grupos han intentado prolongar la semivida de los compuestos agonistas dobles de GluGLP-1 por derivatización con PEG (documento WO2008/101017). Sin embargo dicha derivatización parece ser más eficaz cuando se aplica al extremo C de la molécula en lugar de en el núcleo central de la estructura peptídica, y aun así la fuerza de estos compuestos disminuye en comparación con el péptido correspondiente no modificado.

Por el contrario, los compuestos de la presente invención conservan alta fuerza en los receptores tanto del glucagón como en los del GLP-1 al mismo tiempo que tienen perfiles farmacocinéticos significativamente prolongados en comparación con los péptidos correspondientes no modificados.

El glucagón nativo tiene Ser en la posición 16. Se ha observado que la sustitución con Ala, Gly o Thr reduce significativamente la activación de la adenilato ciclasa en el receptor de glucagón (Unson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994, 91, 454-458). Por tanto, no debería haberse esperado que la derivatización con un sustituyente lipófilo en la posición 16 produjese compuestos que conservasen fuerza en el receptor de glucagón, como sorprendentemente muestran los compuestos descritos en esta memoria descriptiva. En el documento WO2008/101017 se descubrió que un resto cargado negativamente era deseable en la posición 16 para minimizar la pérdida de fuerza. Generalmente, se piensa que la presencia de aminoácidos básicos en las posiciones 17 y 18 es necesaria para la activación completa del receptor de glucagón (Unson et al. J. Biol. Chem. 1998, 273, 10308-10312). Los autores de la presente invención han descubierto que, cuando en la posición 18 hay una alanina, la sustitución con un

aminoácido hidrófobo en la posición 17 puede aún producir un compuesto muy fuerte. Incluso compuestos en los que el aminoácido en la posición 17 está derivatizada con un sustituyente lipófilo, conservan casi toda la fuerza en los receptores tanto de glucagón como en los del GLP-1, mostrando también un perfil farmacocinético significativamente prolongado. Esto es así incluso cuando una lisina en la posición 17 está derivatizada, convirtiendo la cadena lateral amina básica en un grupo amida neutro.

Los autores de la presente invención también han descubierto que los compuestos con acilación en la posición 20 siguen siendo agonistas dobles muy activos, a pesar de las indicaciones de otros estudios en los que la sustitución en la posición 20 debe ser un aminoácido básico que tenga una cadena lateral de 4-6 átomos de longitud para potenciar la actividad del receptor de GLP-1 en comparación con la del glucagón (documento WO2008/101017). Los compuestos descritos en el presente documento conservan la actividad del receptor tanto del glucagón como del GLP-1 cuando la posición 20 está sustituida con lisina y está acilada.

#### Síntesis peptídica

El componente peptídico de los compuestos de la invención puede fabricarse mediante métodos sintéticos convencionales, sistemas de expresión recombinante, o mediante cualquier otro método del campo técnico. De este modo, los péptidos pueden sintetizarse de diversas maneras incluyendo, por ejemplo, un método que comprenda:

(a) sintetizar el péptido por metodología de fase sólida o de fase líquida bien gradualmente o por ensamblaje de fragmentos y aislar y purificar el producto peptídico final;

(b) expresar una construcción de ácido nucleico que codifique el péptido en una célula hospedadora y recuperar el producto de expresión del cultivo de la célula hospedadora; o

(c) efectuar *in vitro* la expresión acelular de una construcción de ácido nucleico que codifique el péptido y recuperar el producto de expresión;

o cualquier combinación de los métodos de (a), (b) y (c) para obtener fragmentos del péptido, ligando posteriormente los fragmentos para obtener el péptido, y recuperando el péptido.

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

#### Sustituyente lipófilo

En el compuesto de la invención una o más de las cadenas laterales de aminoácidos se conjugan con un sustituyente lipófilo Z<sup>1</sup>. Sin desear ligarse a ninguna teoría en particular, se piensa que el sustituyente lipófilo se une a la albúmina en la corriente sanguínea, protegiendo así a los compuestos de la invención de la degradación enzimática, lo cual puede potenciar la semivida de los compuestos. También puede modular la fuerza del compuesto, por ejemplo, con respecto al receptor del glucagón y/o al receptor del GLP-1.

En determinadas realizaciones, solamente una cadena lateral de aminoácidos se conjuga con un sustituyente lipófilo. En otras realizaciones dos cadenas laterales de aminoácidos se conjugan cada una con un sustituyente lipófilo. En otras realizaciones adicionales, tres o incluso más cadenas de aminoácidos se conjugan cada una con un sustituyente lipófilo. Cuando un compuesto contiene dos o más sustituyentes lipófilos, estos pueden ser iguales o diferentes.

El sustituyente lipófilo Z<sup>1</sup> puede unirse covalentemente con un átomo en la cadena lateral de aminoácidos, o como alternativa, puede conjugarse con la cadena lateral de aminoácidos mediante un espaciador Z<sup>2</sup>.

El término "conjugado", como se usa en el presente documento, describe la unión física de un residuo químico identificable con otro, y la relación estructural entre dichos residuos. No debe considerarse que implica algún método de síntesis particular.

Cuando el espaciador Z<sup>2</sup> está presente, se usa para proporcionar una separación entre el compuesto y el residuo lipófilo.

El sustituyente lipófilo puede unirse a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador mediante un éster, un sulfonil éster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Por consiguiente se entenderá que, preferentemente, el sustituyente lipófilo incluye un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S que forma parte del éster, sulfonil éster, tioéster, amida o sulfonamida. Preferentemente, un grupo acilo en el sustituyente lipófilo forma parte de una amida o un éster con la cadena lateral de aminoácidos o el espaciador.

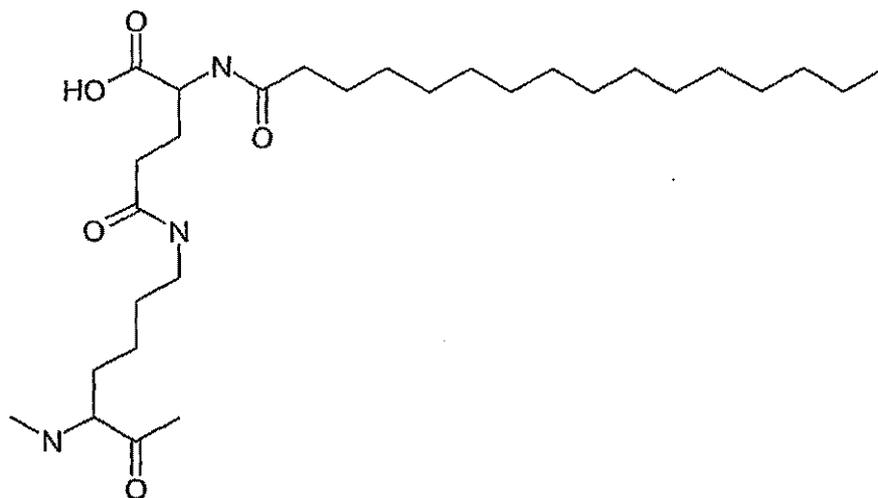
El sustituyente lipófilo puede incluir una cadena hidrocarbonada que tenga de 10 a 24 átomos de C, por ejemplo, de 10 a 22 átomos de C. Preferentemente que tenga al menos 11 átomos de C, y preferentemente que tenga 18 átomos de C o menos. Por ejemplo la cadena hidrocarbonada puede contener 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 átomos de C. La cadena hidrocarbonada puede ser lineal o ramificada y puede estar saturada o insaturada. De lo comentado anteriormente se entenderá que la cadena hidrocarbonada está preferentemente sustituida con un residuo que forma parte de la unión con la cadena lateral de aminoácidos o el espaciador, por ejemplo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O un átomo de S. Más preferentemente, la cadena hidrocarbonada está sustituida con acilo, y por consiguiente la cadena hidrocarbonada puede ser parte de un grupo alcanóilo, por ejemplo, un grupo dodecanoílo, 2-butiloctanoílo, tetradecanoílo, hexadecanoílo, heptadecanoílo, octadecanoílo, o eicosanoílo.

Como se ha mencionado anteriormente, el sustituyente lipófilo  $Z^1$  puede conjugarse con la cadena lateral de aminoácidos mediante un espaciador. Cuando está presente, el espaciador está unido al sustituyente lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos. El espaciador puede estar unido al sustituyente lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos independientemente por un éster, un sulfonil éster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Por consiguiente, puede incluir dos residuos seleccionados independientemente de acilo, sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S. El espaciador puede consistir en una cadena hidrocarbonada  $C_{1-10}$  lineal o más preferentemente una cadena hidrocarbonada  $C_{1-15}$  lineal. Adicionalmente, el espaciador puede sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo  $C_{1-6}$ , alquilamina, hidroxialquilo  $C_{1-6}$  y carboxialquilo.

El espaciador puede ser, por ejemplo, un resto de cualquier aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, el espaciador puede ser un resto de Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn,  $\alpha$ -Glu,  $\gamma$ -Glu,  $\epsilon$ -Lys, Asp, Ser Thr, Gaba, Aib,  $\beta$ -Ala (es decir, 3-aminopropanoilo), 4-aminobutanoilo, 5-aminopentanoilo, 6-aminohexanoilo, 7-aminoheptanoilo, 8-aminooctanoilo, 9-aminononanoilo, 10-aminodecanoilo u 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo. En determinadas realizaciones, el espaciador es un resto de Glu,  $\gamma$ -Glu,  $\epsilon$ -Lys,  $\beta$ -Ala (es decir, 3-aminopropanoilo), 4-aminobutanoilo, 8-aminooctanoilo u 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo. En la presente invención,  $\gamma$ -Glu e iso-Glu se usan indistintamente.

La cadena lateral de aminoácidos con la que el sustituyente lipófilo se conjuga es una cadena lateral de un resto de Glu, Lys, Ser, Cys, Dbu, Dpr u Orn. Por ejemplo puede ser una cadena lateral de un resto de Lys, Glu o Cys. Cuando dos o más cadenas laterales llevan un sustituyente lipófilo, este puede seleccionarse independientemente de estos restos. Por tanto, la cadena lateral de aminoácidos incluye un grupo carboxilo, hidroxilo, tiol, amida o amina, para formar un éster, un éster sulfonilo, un tioéster, una amida o una sulfonamida con el espaciador o sustituyente lipófilo.

En la siguiente fórmula se muestra un ejemplo de un sustituyente lipófilo que comprende un residuo lipófilo  $Z^1$  y un espaciador  $Z^2$ :



En este caso, la cadena lateral de un resto de Lys del péptido de fórmula I está unida covalentemente a un espaciador  $\gamma$ -Glu ( $Z^2$ ) mediante un enlace amida. Un grupo hexadecanoílo ( $Z^1$ ) está unido covalentemente al espaciador  $\gamma$ -Glu mediante un enlace amida. Esta combinación de residuo lipófilo y espaciador, conjugado con un resto de lisina, puede denominarse, de manera abreviada, K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu), por ejemplo, cuando se muestra en fórmulas de compuestos específicos.  $\gamma$ -Glu también puede denominarse isoGlu, y un grupo hexadecanoílo como un grupo palmitoílo. Por tanto será obvio que la anotación (Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu) es equivalente a las anotaciones (isoGlu(Palm)) o (isoGlu(palmitoílo)) como se usa por ejemplo en el documento PCT/GB2008/004121.

El experto será consciente de técnicas adecuadas para la preparación de los compuestos de la invención. Para ejemplos de química adecuada, véanse los documentos WO98/08871, WO00/55184, WO00/55119, Madsen et al (J. Med. Chem. 2007, 50, 6126-32), y Knudsen et al. 2000 (J. Med Chem. 43, 1664-1669).

5 La PEGilación y/o acilación tiene una semivida ( $T_{1/2}$ ) corta, que da lugar a aumentos explosivos de concentraciones de agonista de GluGLP-1. El receptor de glucagón está por tanto sometido a exposición explosiva al agonismo del glucagón una vez (o dos veces) al día durante el periodo de tratamiento.

10 Sin ligarse a ninguna teoría la exposición explosiva repetida del GluR al agonismo del glucagón parece llevar a la destrucción a tránsito de lípidos y de ácidos grasos libres entre el tejido hepático y adiposo con el resultado de que se acumula grasa en el hígado. La exposición constate del GluR al agonismo del glucagón bloquea la acumulación de grasa en el hígado. Por tanto se ha descubierto, que el tratamiento repetido con glucagón o con agonistas dobles de GluGLP-1 de acción corta, da lugar a una dilatación hepática debido a la acumulación de grasa y de glucógeno (Chan et al., 1984. Exp. Mol. Path. 40, 320-327).

15 El tratamiento repetido con agonistas dobles de GluGLP-1 acilados de acción prolongada no da lugar a cambios en el tamaño del hígado (dilatación o reducción) en sujetos con peso normal, pero normaliza el contenido lipídico hepático (Day et al., 2009; Nat.Chem.Biol. 5, 749 - 57).

## 20 Eficacia

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

El experto en la técnica será capaz de establecer formatos de ensayo adecuados y los ejemplos se proporcionan a continuación. El receptor de GLP-1 y/o el receptor de glucagón pueden tener la secuencia de los receptores como se ha descrito en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden hacer uso del receptor de glucagón humano (Glucagón-R) que tiene el número de acceso primario GI: 4503947 (NMP\_000151.1) y/o el receptor del péptido 1 similar a glucagón humano (GLP- 1 R) que tiene el número de acceso primario GI: 166795283 (NP\_002053.3). (Cuando se hace referencia a las secuencias de las proteínas precursoras, debe por supuesto entenderse que los ensayos pueden hacer uso de la proteína madura, que carece de la secuencia señal).

40 Los valores de  $CE_{50}$  pueden usarse como una medición numérica de la fuerza agonista en un receptor determinado. Un valor de  $CE_{50}$  es una medición de la concentración de un compuesto necesaria para conseguir la mitad de la actividad máxima del compuesto en un ensayo particular. Por tanto, por ejemplo, un compuesto que tiene un valor de  $CE_{50}$  [GLP-1R] inferior que el  $CE_{50}$  [GLP-1R] del glucagón nativo en un ensayo particular puede considerarse que tiene una mayor potencia en el GLP-1 R que el glucagón.

45 Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva son normalmente agonistas dobles de Glu-GLP-1, es decir, son capaces de estimular la formación de AMPC tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor puede medirse en ensayos independientes y después de esto compararse entre sí.

50 Mediante la comparación del valor de  $CE_{50}$  para el receptor de glucagón ( $CE_{50}$  [Glucagón-R]) con el valor de  $CE_{50}$  para el receptor de GLP-1, ( $CE_{50}$  [GLP-1R]) para un compuesto determinado puede encontrarse que la selectividad de glucagón relativa (%) de ese compuesto es:

55 **Selectividad de Glucagón-R Relativa [Compuesto] =  $(1/CE_{50}$  [Glucagón-R])x100 /  $(1/CE_{50}$  [Glucagón-R] +  $1/CE_{50}$  [GLP-1 R])**

La selectividad de GLP-1 R relativa puede por tanto encontrarse:

60 **Selectividad de GLP-1 R relativa [Compuesto] =  $(1/CE_{50}$  [GLP-1 R])x100 /  $(1/CE_{50}$  [Glucagón-R] +  $1/CE_{50}$  [GLP-1 R])**

65 La selectividad relativa de un compuesto permite comparar su efecto sobre el receptor de glucagón o GLP-1 directamente con su efecto sobre el otro receptor. Por ejemplo, cuanto mayor es la selectividad de GLP-1 R relativa de un compuesto, mayor es la eficacia del compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón.

Usando los ensayos descritos a continuación, se ha encontrado que la selectividad de GLP-1 relativa para el glucagón humano es aproximadamente de 5 %.

5 Los compuestos de la invención tienen una selectividad de GLP-1 R relativa más elevada en comparación con glucagón humano. Por tanto, para un nivel particular de actividad agonista de glucagón-R, el compuesto presentará un nivel más alto de actividad agonista de GLP-1 R (es decir, una mayor fuerza en el receptor de GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la fuerza absoluta de un compuesto particular en los receptores de glucagón y GLP-1 puede ser mayor, menor o aproximadamente igual que la del glucagón humano nativo, siempre que se consiga la selectividad de GLP-1 R relativa apropiada.

10 Sin embargo, los compuestos de la presente invención pueden tener un valor de  $CE_{50}$  [GLP-1 R] inferior con respecto al glucagón humano. Los compuestos pueden tener un valor de  $CE_{50}$  [GLP-1-R] inferior con respecto al glucagón mientras que al mismo tiempo se mantiene una  $CE_{50}$  [Glucagón-R] que es menor que 10 veces mayor que la del glucagón humano, menor que 5 veces mayor que la del glucagón humano o menor que 2 veces mayor que la del glucagón humano.

15 Puede ser deseable que la  $CE_{50}$  de cualquier compuesto tanto del Glucagón-R como del GLP-1-R deba ser menor que 1 nM

20 Los compuestos de la invención pueden tener una  $CE_{50}$  [Glucagón-R] que sea menor que dos veces la del glucagón humano. Los compuestos pueden tener una  $CE_{50}$  [Glucagón-R] que sea menor que dos veces la del glucagón humano y tener una  $CE_{50}$  [GLP-1 R] que sea menor que la mitad de la de glucagón humano, menor que una quinta parte de la del glucagón humano o menor que una décima parte de la del glucagón humano.

25 La selectividad de GLP-1 relativa de los compuestos puede ser mayor que 5 % y menor que 95 %. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una selectividad relativa de 5-20 %, 10-30 %, 20-50 %, 30-70 % o 50-80 %; o de 30-50 %, 40-60 %, 50-70 % o 75-95 %.

#### 30 Usos terapéuticos

Los compuestos de la invención pueden proporcionar una opción de tratamiento atractiva para enfermedades metabólicas que incluyen la obesidad y la diabetes mellitus (diabetes).

35 La diabetes comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de insulina o ambas cosas. Los síntomas agudos de la diabetes incluyen la producción de orina excesiva, dando como resultado sed compensatoria y aumento de la ingesta de líquidos, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, letargo y cambios en el metabolismo energético. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con lesión prolongada, disfunción y fallo de diversos órganos, particularmente los ojos, riñones, nervios, vasos del corazón y sanguíneos. La diabetes se clasifica en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional en función de las características patogenéticas.

40 La diabetes de tipo 1 representa el 5-10 % de todos los casos de diabetes y está causada por una destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  pancreáticas secretoras de insulina.

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

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

La prediabetes incluye glucosa alterada en ayunas y tolerancia alterada a glucosa y se refiere a aquellos estados que se producen cuando los niveles de glucemia están elevados por debajo de los niveles que se establecen para el diagnóstico clínico para la diabetes.

55 Una gran parte de personas con diabetes de tipo 2 y prediabetes tienen un alto riesgo de morbilidad y mortalidad debido a la alta frecuencia de factores de riesgo metabólicos adicionales que incluyen obesidad abdominal (exceso de tejido graso alrededor de los órganos internos abdominales), dislipidemia aterogénica (trastornos lipídicos en la sangre, incluyendo altos niveles de triglicéridos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, que fomentan la acumulación de placas en las paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión) un estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno o inhibidor del activador de plasminógeno 1 en sangre altos) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en la sangre).

60 Al contrario, la obesidad confiere un riesgo aumentado de desarrollo de prediabetes, diabetes de tipo 2 así como por ejemplo de determinados tipos de cáncer, apnea del sueño obstructiva y enfermedad de la vesícula biliar.

65

La dislipidemia está asociada con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular. La lipoproteína de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) es de importancia clínica dado que existe una correlación inversa entre las concentraciones de HDL en plasma y riesgo de enfermedad aterosclerótica. La mayoría del colesterol almacenado en las placas ateroscleróticas se origina a partir de LDL y por tanto las concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) están estrechamente asociadas con la aterosclerosis. La relación de HDL/LDL es un indicador de riesgo clínico para la aterosclerosis y la aterosclerosis coronaria en particular.

Sin el deseo de limitarse a ninguna teoría particular, se piensa que los compuestos de la invención actúan como agonistas dobles de GluGLP-1. El agonista doble combina el efecto del glucagón, por ejemplo, sobre el metabolismo de las grasas, con el efecto del GLP-1, por ejemplo, sobre los niveles de glucemia e ingesta de alimento. Estos podrían actuar por lo tanto acelerando la eliminación de excesivo tejido adiposo, inducir la pérdida de peso sostenible y mejorar el control glucémico. Los agonistas dobles de GluGLP-1 también podrían actuar para reducir los factores de riesgo cardiovasculares tales como colesterol y colesterol LDL elevados.

Los compuestos de la presente invención pueden por lo tanto usarse como agentes farmacéuticos para prevenir el aumento de peso, promover la pérdida de peso, reducir el sobrepeso o tratar la obesidad (por ejemplo controlando el apetito, la alimentación, la ingesta de alimento, la ingesta de calorías y/o el gasto energético), incluyendo obesidad mórbida, así como enfermedades y afecciones asociadas, que incluyen, pero sin limitación, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula relacionada con obesidad y la apnea del sueño inducida por obesidad. Los compuestos de la invención también pueden usarse para el tratamiento de la resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, prediabetes, glucosa en ayuno aumentada, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia (o una combinación de estos factores de riesgo metabólicos), aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria coronaria e ictus. Todas estas son afecciones que pueden estar asociadas con la obesidad. Sin embargo, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas afecciones pueden mediar totalmente o en parte mediante un efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

#### Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos, pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para el almacenamiento o administración, que normalmente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal del mismo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, del tipo de mamífero que se esté tratando y de las características físicas del mamífero específico que se está considerando. Estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad son bien conocidos por los médicos expertos en la técnica médica. Esta cantidad y el método de administración pueden ajustarse a medida para conseguir la eficacia óptima y pueden depender de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores bien conocidos por los expertos en la técnica de la medicina. Los tamaños de dosificación y el régimen de dosificación más apropiados para el uso humano pueden estar guiados por los resultados obtenidos por la presente invención y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados apropiadamente.

Una dosificación y un protocolo de tratamiento eficaz pueden determinarse mediante medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y después aumentando la dosificación controlando al mismo tiempo los efectos y variando también sistemáticamente el régimen de dosificación. Numerosos factores pueden tomarse en cuenta por un médico cuando se determina una dosificación óptima para un sujeto determinado. Dichas consideraciones son conocidas por el experto en la técnica.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, puede usarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a un pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes tampón de pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris/hidroximetil) amino metano (TRIS), ácido N-Tris (hidroximetil) metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato de amonio, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina o acetato o mezclas de los mismos. El término incluye adicionalmente cualquiera de los agentes indicados en la Farmacopea de Estados Unidos para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a la sal de los compuestos. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Como ejemplos de sales de adición de ácido se incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Como ejemplos de sales básicas se incluyen sales en las que el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio e iones de amonio  $^+N(R^3)_3$  ( $R^4$ ), donde  $R^3$  y  $R^4$  designan independientemente alquilo  $C_{1-6}$  sustituidos opcionalmente, alqueno  $C_{2-6}$  sustituidos opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se

describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes, y en la Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

5 "Tratamiento" es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, un resultado clínico beneficioso o deseado incluye, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, la disminución del alcance de enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o alivio de la patología y remisión (parcial o total), detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. El "tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o modificar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere a un tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Los que requieren tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que se tiene que prevenir el trastorno. Por tratamiento se entiende inhibir o reducir un aumento en la patología o síntomas (por ejemplo, aumento de peso, hiperglucemia) cuando se compara con la ausencia de tratamiento, y no significa necesariamente que implique el cese completo de la afección relevante.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades individuales de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, oblea o un propio comprimido o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en una forma inyectable monodosis, por ejemplo en forma de un bolígrafo. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen aquellos usados en formulaciones adecuadas para la administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica o transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

30 Los modos de administración subcutánea o transdérmica pueden ser particularmente adecuados para los compuestos descritos en el presente documento.

#### Terapia de combinación

35 Los compuestos de la invención pueden administrarse como parte de una terapia de combinación con un agente para el tratamiento de la diabetes, obesidad, dislipidemia o hipertensión.

En dichos casos, los dos agentes activos pueden proporcionarse juntos o por separado y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

40 Por tanto el compuesto de la invención (o la sal del mismo) puede usarse en combinación con un agente antidiabético que incluye pero sin limitación metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona o insulina. En una realización preferida el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina, un inhibidor de DPP-IV, sulfonilurea o metformina, particularmente sulfonilurea o metformina, para conseguir un control glucémico adecuado. En una realización incluso más preferida el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina o un análogo de insulina para conseguir un control glucémico adecuado. Como ejemplos de análogos de insulina se incluyen pero sin limitación Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix, Actraphane HM, Levemir y Apidra.

50 El compuesto, o la sal del mismo, puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad que incluye, pero sin limitación, un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón, el péptido YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor canabinoide 1, un inhibidor de lipasa, un agonista del receptor 4 de melanocortina o un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina.

55 El compuesto o sal del mismo puede usarse en combinación con un agente antihipertensión, incluyendo, pero sin limitación, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de angiotensina II, diuréticos, un beta bloqueante o un bloqueante de los canales de calcio.

60 El compuesto o sal del mismo puede usarse en combinación con un agente antidislipemia, incluyendo, pero sin limitación una estatina, un fibrato, una niacina, y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.

## MÉTODOS

### Síntesis general de análogos de glucagón acilados

65

Se realizó síntesis peptídica en fase sólida en un Sintetizador Peptídico CEM Liberty usando química Fmoc convencional. La resina TentaGel S Ram (1 g; 0,25 mmol/g) se hinchó en NMP (10 ml) antes de su uso y se transfirió entre tubos y recipientes de reacción usando DCM y NMP.

5 *Acoplamiento:*

A la resina se añadió un Fmoc-aminoácido en NMP/DMF/DCM (1:1:1; 0,2 M; 5 ml) en una unidad de microondas Discover CEM junto con HATU/NMP (0,5 M; 2 ml) y DIPEA/NMP (2,0 M; 1 ml). La mezcla de acoplamiento se calentó a 75 °C durante 5 minutos al mismo tiempo que se burbujeaba nitrógeno a través de la mezcla. Después la resina se lavó con NMP (4 x 10 ml).

10 *Desprotección:*

Se añadió piperidina/NMP (20 %; 10 ml) a la resina para la desprotección inicial y la mezcla se calentó al microondas (30 segundos, 40 °C). El recipiente de reacción se vació y se añadió una segunda parte de piperidina/NMP (20 %; 10 ml) y de nuevo se calentó (75 °C; 3 minutos). Después, la resina se lavó con NMP (6 x 10 ml).

20 *Acilación de la cadena lateral:*

El Fmoc-Lys(ivDde)-OH o, de manera alternativa, otro aminoácido con un grupo protector de cadena lateral ortogonal se introdujo en la posición de la acilación. El N terminal de la estructura peptídica se protegió después con Boc usando Boc<sub>2</sub>O o, como alternativa, usando un aminoácido protegido con Boc, en el último acoplamiento. Mientras que el péptido aún permanecía unido a la resina, el grupo protector de cadena lateral ortogonal se escindió selectivamente usando hidrato de hidracina (2-4 %) recién preparado en NMP durante 2 x 15 minutos. La cadena lateral de lisina desprotegida se acopló primero con Fmoc-Glu-OtBu o con otro aminoácido espaciador, que se desprotegió con piperidina y se aciló con un residuo lipófilo usando la metodología de acoplamiento peptídico como se ha descrito anteriormente.

Las abreviaturas empleadas son las siguientes:

30 ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)3-metil-butilo  
 Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-etilo  
 DCM: diclorometano  
 DMF: *N,N*-dimetilformamida  
 DIPEA: diisopropiletilamina  
 EtOH: etanol  
 Et<sub>2</sub>O: éter dietílico  
 HATU: Hexafluorofosfato de N óxido de *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanaminio  
 MeCN: acetonitrilo  
 NMP: *N*-metilpirrolidona  
 TFA: ácido trifluoroacético  
 TIS: triisopropilsilano

*Escisión:*

35 La resina se lavó con EtOH (3 x 10 ml) y Et<sub>2</sub>O (3 x 10 ml) y se secó hasta un peso constante a temperatura ambiente (t.a.). El péptido en bruto se escindió de la resina por tratamiento con TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5; 40 ml, 2 h; t.a.). La mayor parte del TFA se retiró a presión reducida y el péptido en bruto se precipitó y se lavó tres veces con éter dietílico y se secó hasta un peso constante a temperatura ambiente.

40 *Purificación con HPLC del péptido en bruto:*

El péptido en bruto se purificó a más del 90 % por HPLC de fase inversa preparativa usado una estación de trabajo de VISION Biosystems PerSeptive provista con una columna C-18 (5 cm; 10 µm) y un colector de fracciones y se procesó a 35 ml/min con un gradiente de tampón A (TFA al 0,1 %, ac.) y tampón B (TFA al 0,1 %, MeCN al 90 %, ac.). Las fracciones se analizaron por HPLC analítica y EM y las fracciones relevantes se agruparon y liofilizaron. El producto final se caracterizó por HPLC y EM.

Generación de líneas celulares que expresan receptores de glucagón y de GLP-1 humano

50 Se clonó el ADNc que codifica el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) (número de acceso primario P47871) o el receptor de péptido 1 similar a glucagón humano (GLP-1-R) (número de acceso primario P43220) a partir de los clones de ADNc BC104854 (MGC: 132514/IMAGE: 8143857) o BC112126 (MGC: 138331/IMAGE: 8327594),

respectivamente. El ADN que codifica el Glucagón-R o el GLP-1-R se amplificó por PCR usando cebadores que codifican sitios de restricción terminales para la subclonación. Los cebadores del extremo 5' adicionalmente codificaron una secuencia consenso Kozak cercana para garantizar la traducción eficaz. La fidelidad del ADN que codifica el Glucagón-R y el GLP-1-R se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los productos de PCR que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se subclonaron en un vector de expresión de mamífero que contenía un marcador de resistencia a neomicina (G418).

Los vectores de expresión de mamífero que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron en células HEK293 mediante un método de transfección con fosfato de calcio convencional. 48 horas después de la transfección las células se sembraron para una clonación a dilución limitada y se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 en el medio de cultivo. Tres semanas después, se seleccionaron 12 colonias supervivientes de células que expresaban Glucagón-R y GLP-1-R, se propagaron y se sometieron a ensayo en los ensayos de eficacia de Glucagón-R y GLP-1-R como se describe más adelante. Para realizar la creación del perfil del compuesto se seleccionó un clon que expresaba Glucagón-R y un clon que expresaba GLP-1-R.

#### Ensayos de eficacia del receptor de glucagón y del receptor de GLP-1

Se sembraron células HEK293 que expresaban el Glucagón-R o el GLP-1-R humano a 40.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina al 0,01 % y se cultivaron durante 1 día en cultivo en 100 µl de medio de cultivo. El día del análisis, el medio de cultivo se eliminó y las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón Tyrode. Las células se incubaron en 100 µl de tampón Tyrode que contenía concentraciones crecientes de péptidos de ensayo, IBMX 100 µM y glucosa 6 mM durante 15 min a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 25 µl de HCl 0,5 M y se incubó en hielo durante 60 minutos. El contenido de AMPc se calculó usando el kit de AMPc FlashPlate® de Perkin-Elmer. El valor de CE<sub>50</sub> y las eficacias relativas en comparación con los compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se estimaron mediante un ajuste de curva con ayuda de un ordenador.

#### Método de exploración bioanalítica para la cuantificación de agonistas peptídicos de Glu-GLP1 en plasma de ratón después de administración subcutánea

Los ratones recibieron por vía subcutánea (s.c.) una dosis de 100 nmol/kg. Los ratones se sacrificaron y se extrajo sangre en los siguientes momentos: 0,5, 2, 4, 6, 16 y 24 h. Las muestras plasmáticas se analizaron usando precipitación con proteínas, seguido de extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía líquida - espectrometría de masas (CL-EM).

#### Ensayo de Tolerancia a Glucosa Oral (ETGO), lípidos en sangre y peso corporal en ratones normales C57Bl/6J con una dieta rica en grasa y HbA1c en ratones db/db

Se aclimataron ratones macho (C57Bl/6J con dieta prolongada rica en grasa, C57Bl/6J con dieta de breve duración rica en grasa y db/db) con acceso libre a agua y a alimento. Se instalaron en jaulas en grupos de 5 a 6 en una sala con luz, temperatura y humedad controladas (12 horas de luz:12 horas de oscuridad; luces Encendidas/Apagadas a las 20:00/08:00 horas; 24 °C; 50 % de humedad relativa).

Durante un periodo de tres días los animales recibieron una inyección s. c. de vehículo 100 µl (una vez al día) para acostumbrarlos a la manipulación y a las inyecciones. Se extrajeron muestras sanguíneas del ojo o de la punta de la cola. Los animales se asignaron al azar antes del tratamiento.

Los ratones se trataron dos veces al día s.c. con agonista de GluGLP-1 o vehículo (volumen de inyección = 2,5 ml/kg). A lo largo del estudio, los pesos corporales se registraron diariamente y se usaron para administrar las dosis correctas del péptido en función del peso corporal. Las soluciones peptídicas se prepararon recientes inmediatamente antes de dosificarlas.

Se realizaron ensayos de tolerancia a glucosa oral (ETGO) después de someter a los animales a un ayuno corto. Para evitar confusiones con la ingesta de alimento, los animales se mantuvieron en ayunas durante los ETGO. Después de la dosificación del péptido se tomó una muestra de sangre inicial. Después de esto, se proporcionó una dosis oral de glucosa (1 g/kg) disuelta en tampón fosfato (pH = 7,4) (5 ml/kg), y los animales regresaron a sus jaulas iniciales (t = 0). Se midió la glucosa en sangre (GS) total a t=15 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos, t=90 minutos y t=120 minutos.

La concentración de GS se analizó mediante el método de la glucosa oxidasa inmovilizada usando una gota de sangre (< 5 µl; Autoanalizador Elite, Bayer, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Determinación de HbA1c

Determinando el nivel de hemoglobina A1C (HbA1c) es posible evaluar el efecto prolongado de un compuesto sobre

un nivel de glucosa del sujeto. La HbA1c es una forma de hemoglobina glucosilada cuyo nivel en una célula refleja el nivel promedio de glucosa al cual la célula se ha expuesto a lo largo de su vida. En ratones, la HbA1c es un biomarcador relevante para el nivel de glucemia promedio durante las 4 semanas siguientes, debido a que la conversión a HbA1c está limitada por la duración de los eritrocitos de aproximadamente 47 días (Abbrecht & Littell, 1972; J. Appl. Physiol. 32, 443-445).

La determinación de la HbA1c está basada en un Inmunoensayo de Inhibición Turbidimétrico (TINIA, *Turbidimetric INhibition ImmunoAssay*) en el que la HbA1c en la muestra reacciona con anti-HbA1c para formar complejos de antígeno-anticuerpo solubles. Las adiciones de polihaptenos reaccionan con exceso de anticuerpos anti HbA1c para formar un complejo de anticuerpo-polihapteno insoluble, que puede medirse turbidimétricamente. La hemoglobina liberada en la muestra hemolizada se convierte en un derivado que tiene un espectro de absorción característico, que se mide bicromáticamente durante las fases de preincubación. El resultado final se expresa como porcentaje HbA1c de hemoglobina total (Cobas®, norma de aplicación A1C-2).

#### Determinación del nivel de colesterol

El ensayo es un método colorimétrico enzimático. En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma selectivamente complejos solubles en agua con LDL, VLDL y quilomicrones, que son resistentes a enzimas modificadas por PEG. El colesterol HDL se determina enzimáticamente mediante la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amino. Los ésteres de colesterol se degradan cuantitativamente en colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol HDL se oxida enzimáticamente a coles-4-en-3-ona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado se mide colorimétricamente (norma de Aplicación Cobas®; HDLC3).

La determinación directa de LDL aprovecha la solubilización micelar selectiva de LDL mediante un detergente noniónico y la interacción de un compuesto de azúcar y lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). La combinación de un compuesto de azúcar con detergente permite la determinación selectiva de LDL en plasma. El principio del ensayo es el mismo que el del colesterol y HDL, pero debido al azúcar y al detergente solamente los ésteres de colesterol LDL se degradan a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida después y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado se mide colorimétricamente (norma de Aplicación Cobas®; LDL\_C).

#### **Aumento de peso corporal en ratones C57BL/6J con dieta rica en grasa.**

Ratones macho C57BL/6J, de 6 meses de vida, se aclimataron a su nuevo entorno durante 4 semanas con libre acceso a una dieta rica en grasa (DRG) (D12492, Research Diet Inc., New Brunswick, USA) y agua. Los animales recibieron una inyección s.c. de vehículo 100 µl durante un periodo de tres días para que se acostumbraran a la manipulación y a las inyecciones, antes del inicio del tratamiento con el péptido. Los ratones se trataron dos veces al día s.c. con exendina-4, Compuesto 3, Compuesto 6, Compuesto 7, Compuesto 8, Compuesto 11 y Compuesto 12 o vehículo. A lo largo del estudio, se registraron los pesos corporales diariamente y se usaron para administrar las dosis de péptido corregidas en función del peso corporal. Todos los animales se sacrificaron el mismo día por dislocación cervical.

#### **Tolerancia a glucosa oral 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h después de la dosificación en ratones C57BL/6J con una dieta rica en grasa**

Ratones macho C57BL/6J, de 6 semanas de vida, se aclimataron a su nuevo entorno con libre acceso a una dieta rica en grasa (D12492, Research Diet Inc., New Brunswick, USA) y agua. Los animales recibieron una inyección s.c. de péptido durante un periodo de tres días para que se acostumbraran a la manipulación y a las inyecciones. Se extrajeron muestras de sangre de la punta de la cola y se midió la glucemia. La concentración de glucemia (mM) se analizó mediante el método de la glucosa oxidasa inmovilizada usando una gota de sangre (< 5 µl; Analizador Contour, Bayer, Dinamarca) siguiendo el manual del fabricante. Después de 4 semanas con una dieta una rica en grasa, los animales se pesaron y el peso corporal se usó para administrar una dosis de péptido corregida en función del peso corporal. Se realizó un ensayo de tolerancia a glucosa oral (ETGO) después de someter a los animales a 4 horas de ayuno. Después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de la dosificación de solo péptido o vehículo, se extrajo una muestra inicial de sangre (t=-0 min). Inmediatamente después de esto, se tomó una dosis oral de glucosa (1 g/kg) y los animales regresaron a sus jaulas iniciales (t = 0). Se midieron los niveles de GS a t=15 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos y t=90 minutos. Inmediatamente después de tomar las muestras de sangre, todos los animales se sacrificaron mediante anestesia con CO<sub>2</sub> seguido de dislocación cervical.

#### **Ingesta de alimento en ratones C57BL/6J jóvenes delgados y viejos obesos.**

Durante 11 días, ratones C57BL/6J se alimentaron con una dieta rica en grasa y durante 52 semanas ratones C57BL/6J se alimentaron con una dieta rica en grasa. Tres días antes del estudio, los ratones se transfirieron a jaulas individuales y se pesaron. Cuatro días antes del estudio, se aclimataron a la manipulación y al tratamiento mediante inyecciones diarias s.c. El día antes del experimento se retiró el alimento a las 20:00 horas. El día del experimento, los ratones se pesaron y se trataron con inyecciones s.c. de Exendina-4, Compuesto 7 o Vehículo a t=0 h (8:00) y t=12 h (20:00). Inmediatamente después del tratamiento (t=0), la comida previamente pesada se introdujo en los ratones y la ingesta de alimento acumulativa se midió pesando el alimento restante después de t=1,

2, 4, 8, 12 y 24 horas. Después de pesar el alimento comida y los animales a t=24 h, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

## Formación de AMPc en hepatocitos.

5

### Procedimiento experimental

Hepatocitos humanos primarios proporcionados por Lonza Walkersville, Inc. se lavaron cuidadosamente en tampón TB y se incubaron a 37 °C con péptidos disueltos en tampón TB complementado con IBMX 100 μM y caseína al 0,1 % durante 15 minutos. Antes de añadir a las células, las diluciones peptídicas se precalentaron a 37 °C. La reacción se detuvo por adición de 25 μl de HCL 0,5 M enfriado en hielo, y las células se incubaron en hielo durante 60 minutos. El contenido de AMPc en los pocillos se determinó añadiendo 25 μl de los extractos ácidos de los pocillos a 75 μl de tampón acetato sódico, pH 6,2, en "FlashPlates" de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con centelleo y anticuerpos anti-AMPc. Después de la adición de 100 μl de solución [<sup>125</sup>I]AMPc 10 μCi a cada pocillo, las placas se incubaron durante una noche a 4 °C, se vaciaron, y la cantidad de [<sup>126</sup>I]AMPc unido a las FlashPlates se contó usando el programa "flashplate [<sup>125</sup>I]AMPc 10 min" en el TopCount NXT.

Los péptidos se ensayaron a un intervalo de concentración de 0,1 - 1000 nM.

### Análisis de datos y estadísticos

La cantidad de AMPc producida por las células se calculó por extrapolación con una curva convencional de AMPc.

25

Los valores CE<sub>50</sub> se estimaron ajustando los datos de AMPc a la fórmula siguiente usando Sigma Plot:

$$\text{AMPc respuesta} = \frac{(\text{AMPc}_{\text{máx}} - \text{AMPc}_{\text{min}}) \times c}{c + \text{CE}_{50}} + \text{AMPc}_{\text{min}}$$

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

30

### Peso hepático/peso corporal de ratones C57BL/6J.

Los ratones se trataron dos veces al día s.c. con el Comp. 1 y el Comp. 11 (a dos dosis: 0,5 y 5 nmol/kg) o con vehículo durante 2 semanas. A lo largo del estudio, se registraron los pesos corporales diariamente y se usaron para administrar las dosis de péptido corregidas en función del peso corporal. El día del sacrificio, el hígado se expuso y se pesó.

35

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: síntesis de compuestos y propiedades peptídicas

40 *Ejemplo de síntesis:*

El compuesto 9 se sintetizó en un Sintetizador Peptídico Liberty CEM usando resina TentaGel S Ram (1,17 g; 0,23 mmol/g) y química Fmoc como se ha descrito anteriormente. Se usó Fmoc-Lys(ivDde)-OH en la posición 17 y se usaron las pseudoprolinas Fmoc-Phe-Thr(.Psi. Me, Me pro)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-Ser(.Psi., Me, Me pro)-OH en la estructura peptídica. Después de finalizar la estructura peptídica en la resina, el grupo Fmoc N terminal se escindió manualmente seguido de protección con Boc usando Boc<sub>2</sub>O (226 mg) y DIEA (54 ml) en DCM. Después, el grupo ivDde se escindió con hidrato de hidrazina/NMP recién preparado (4 %; 2 x 15 min.). De nuevo, en el Sintetizador Peptídico Liberty CEM los dos bloques de las construcciones restantes, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido hexadecanoico, se añadieron a la cadena lateral de lisina desprotegida.

50

El péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente, y la purificación se realizó en una columna Gemini-NX (5 cm, 10 mm, C18) con un flujo a 35 ml/min de una mezcla de tampón A (TFA al 0,1 %, ac.) y tampón B (TFA al 0,1 %, MeCN al 90 %, ac.). El producto se eluyó con un gradiente lineal de tampón B del 25 % al 65 % durante 47 minutos y las fracciones (9 ml) se recogieron con un recogedor de fracciones. Las fracciones relevantes se analizaron mediante HPLC analítica y EM y las fracciones con pureza superior al 95 % se agruparon y liofilizaron hasta convertirse en un polvo blanco. Los 72 mg producidos tenían una pureza del 97 % determinada por HPLC analítica y la masa era de 3697.05 Da determinada por EM (Calc. 3696.97 Da).

55

#### Ejemplo 2: Eficacia sobre los receptores de GLP-1 y glucagón

60

La eficacia de los agonistas de GluGLP-1 se calculó exponiendo células que expresaban hGlucagónR y hGLP-1R a los compuestos acilados indicados en la lista a concentraciones en aumento y midiendo el AMPc formado como se describe en Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Valores CE<sub>50</sub> de compuestos acilados en los receptores de GLP-1 y Glucagón

Secuencia	Compuesto	CE <sub>50</sub> (nM) GLP-1R	CE <sub>50</sub> (nM) GluR
H-HSQTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 1	0,06	0,06
H-HSQTFTSDYSKYLD-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-KAAHDFVEWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 2	0,20	0,13
H-HSQTFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil - $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 3	0,11	0,12
H-HSQTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil - $\gamma$ -Glu)-DFVEWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 4	0,10	0,04
H-HSQTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K(Hexadecanoil - $\gamma$ -Glu)-RA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 5	0,57	0,22
H-HSQTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil - $\gamma$ -Glu)-A-NH <sub>2</sub>	Compuesto 6	0,09	0,10
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 7	0,11	0,16
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AARDFVAWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 9	0,12	0,17
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-DFVAWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 10	0,15	0,63
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 11	0,09	0,16
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-A-NH <sub>2</sub>	Compuesto 12	0,27	0,27
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 13	0,08	0,26
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Dodecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 14	0,14	0,78
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[3-aminopropanoil])-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 15	0,23	1,87
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[8-aminooctanoil])-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 16	0,24	0,46
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\epsilon$ -Lys)-AAHDFVEWLLSA-NH <sub>2</sub>	Compuesto 17	0,09	0,39

Los restos marcados con ( ) forman un anillo de lactama intramolecular.

Tabla 1a. Valores CE<sub>50</sub> de compuestos acilados adicionales de acuerdo con la invención

Secuencia	Compuesto	CE <sub>50</sub> (nM)GLP-1R	CE <sub>50</sub> (nM) GluR
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLS-OH	Compuesto 18	0,066	0,091
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLL-OH	Compuesto 19	0,048	0,483
H-H-Aib-EGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-OH	Compuesto 20	0,057	13,266
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-OH	Compuesto 21	0,077	0,150
H-H-Aib-EGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 22	0,014	26,370
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 23	0,140	0,124
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K([2-Butilooctanoil]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 24	0,161	0,133
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Octadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 25	0,069	0,103
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Dodecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 26	0,097	0,116
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-[4-aminobutanoil])-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 27	0,152	0,147
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 28	0,149	0,108
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-[8-aminooctanoil])-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 29	0,199	0,123
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoLys)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 30	0,132	0,110
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-[3-aminopropanoil])-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 31	0,103	0,151
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-Om(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 32	0,195	0,193
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-YLDKAAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 33	0,131	0,389
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-KAAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 34	0,109	0,053
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-KAA-K(Hexadecanoil-isoGlu)-DFVEWLLSA-NH2	Compuesto 35	0,202	0,180
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-KAAHDFV-K(Hexadecanoil-isoGlu)-WLLSA-NH2	Compuesto 36	0,191	0,213
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-KAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil-isoGlu)-A-NH2	Compuesto 37	0,207	0,147
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoLys)-AARDFAWLLRA-NH2	Compuesto 38	0,132	0,183
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 39	0,16	0,24
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 40	0,20	0,18
H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-S-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHEFVEWLLSA-NH2	Compuesto 41	0,13	0,08

H-H-Aib-QGTFSTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAEDFVEWLLSA-NH2	Compuesto 42	0,03	0,27
H-H-Aib-QGTFSTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLLEA-NH2	Compuesto 43	0,082	0,12

El compuesto 28 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA-NH2 también puede escribirse como H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\alpha$ Glu)-AAHDFVEWLLSA-NH2

### Ejemplo 3: exploración farmacocinética:

5 Se determinaron los perfiles farmacocinéticos de diversos compuestos acilados. Los valores  $T_{1/2}$  calculados se muestran en la Tabla 2, en comparación con el compuesto 1 (no acilado).

**Tabla 2**

Compuesto	$T_{1/2}$ (h)
1	0,23
2	5,8
5	5,3
4	2,0*
6	4,8
7	3,4
9	2,4*
11	4,9
12	6,0
13	6,4
*: Para calcular la $T_{1/2}$ solo se usaron dos momentos	

10 Todos los compuestos acilados habían mejorado la  $T_{1/2}$  en comparación con el compuesto 1.

En la Figura 1 se muestra una muestra de perfil farmacocinético del compuesto 13.

### 15 Ejemplo 4: Ensayo de tolerancia a glucosa oral en ratones DIO

Efecto de la administración del compuesto 11 (10 nmol/kg) por vía s.c durante 21 días sobre la tolerancia a glucosa oral en ratones C57BL/6J con una dieta prolongada rica en grasa. Los ratones con una dieta rica en grasa se mantuvieron en ayunas y se tomó una muestra inicial de sangre para determinar el nivel de glucemia en ayunas (t=0). Después recibieron una dosis oral de glucosa (1 g/kg en 5 ml/kg) y se midieron los niveles de glucemia a t=30 min, t=60 min, t=90 min y t=120 min. El compuesto 11 mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa (ANOVA bilateral). Los datos se muestran como media  $\pm$  ETM.

### 25 Ejemplo 5: HbA1c en ratones db/db después de 28 días

Se trataron ratones diabéticos (db/db) con vehículo o con compuesto 7 durante 4 semanas, y se determinó el valor de HbA1c (Cobas® norma de aplicación: A1 C-2) en muestras de sangre entera (20 ml) extraída de los ratones tratados. En la Figura 3 se muestran los resultados. El valor  $\Delta$ HbA1c ( %) se calculó en cada ratón restando su HbA1c ( %) al inicio del tratamiento de la HbA1c ( %) a las 4 semanas. El tratamiento con el compuesto 7 disminuyó significativamente  $\Delta$ HbA1c ( %). (P = 0,03; ensayo de la t de Student) en comparación con vehículo.

### Ejemplo 6: peso corporal reducido

35 El efecto de la administración del compuesto 11 por vía s.c. durante 21 días sobre el peso corporal se determinó en ratones C57BL/6J con una dieta prolongada rica en grasa. Los ratones macho C57BL/6J con una dieta rica en grasa (DRG) se trataron (d.v.d.; s.c.) con el compuesto 11 (10 nmol/kg) o con vehículo. Los pesos corporales se registraron diariamente y se usaron para administrar las dosis del péptido corregidas en función del peso corporal a lo largo del estudio. Los datos se muestran como media  $\pm$  ETM en la Figura 4. El compuesto 11 disminuyó significativamente el peso corporal (p<0,05).

### 40 Ejemplo 7: colesterol total y relación HDL/LDL

45 Ratones con Obesidad Inducida por Dieta (DIO) se trataron con vehículo o con compuesto 7 durante 4 semanas y se preparó plasma de las muestras sanguíneas extraídas. En cada muestra de plasma se determinó el colesterol total, LDL y HDL (Cobas® normas de aplicación: CHOL2, HDLC3 y LDL\_C) y los resultados se muestran en las Figuras 5

y 6. El tratamiento con el compuesto 7 disminuyó de manera significativa ( $P < 0,0001$ , ensayo de la  $t$  de Student) las concentraciones de colesterol total (Figura 5) y aumentó de manera significativa ( $P < 0,0001$ , ensayo de la  $t$  de Student) la relación HDL/LDL (Figura 6).

#### 5 **Ejemplo 8: aumento de peso corporal en ratones C57BL/6J con dieta rica en grasas.**

10 Efecto de la administración s.c. durante 10 días de Exendina-4, Compuesto 8, Compuesto 3, Compuesto 7, Compuestos 11, Compuesto 12 y Compuesto 6 en ratones C57BL/6J con dieta de breve duración rica en grasa. Se trataron ratones C57BL/6J alimentados con una dieta rica en grasa (DRG) (d.v.d.; s.c.) (0,5 y 5 nmol/kg) o con vehículo. Los pesos corporales se registraron diariamente y se usaron para administrar las dosis de péptido corregidas en función del peso corporal a lo largo del estudio. En la Figura 7 se muestran los datos como media  $\pm$  ETM.

15 El péptido de control (exendina-4) así como el Compuesto 8, disminuyeron significativamente el aumento de peso corporal a ambas dosis (0,5 y 5 nmol/kg). El Compuesto 3, Compuesto 7, Compuesto 11 y el Compuesto 12 disminuyeron significativamente el aumento de peso corporal a la dosis alta (5 nmol/kg) pero no la dosis baja (0,5 nmol/kg) (Fig.7). El Compuesto 6 disminuyó significativamente el aumento de peso corporal solo a la dosis baja (0,5 nmol/kg).

#### 20 **Ejemplo 9: tolerancia a glucosa oral 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h después de dosificación en ratones C57BL/6J con dieta rica en grasas**

25 Se realizó un ensayo de tolerancia a glucosa oral (ETGO) después de someter a los animales a 4 horas de ayuno. Después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de dosificar el Compuesto 7 o el vehículo se extrajo una muestra de sangre inicial ( $t=0$  min). Inmediatamente después de esto, se proporcionó una dosis oral de glucosa (1 g/kg). Los niveles de GS se midieron a  $t=15$  min,  $t=30$  min,  $t=60$  min y  $t=90$  min. Inmediatamente después de realizar el muestreo sanguíneo, todos los animales se sacrificaron mediante anestesia con  $\text{CO}_2$  seguido de dislocación cervical. El estudio muestra que la administración subcutánea del Compuesto 7 (10 nmol/kg) aumenta significativamente la tolerancia a la glucosa (medida como una disminución del ABC durante un ensayo de tolerancia a glucosa oral) después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de la dosificación en ratones C57BL/6J con dieta rica en grasa.

#### 30 **Ejemplo 10: ingesta de alimento en ratones C57BL/6J delgados jóvenes y obesos mayores.**

35 Ratones C57BL/6J estuvieron con una dieta rica en grasas durante 11 días y ratones C57BL/6J estuvieron con una dieta rica en grasas durante 52 semanas. El día del experimento, los ratones se pesaron y se trataron con inyecciones s.c. de Exendina-4, Compuesto 7 o Vehículo a  $t=0$  h (8:00) y  $t=12$  h (20:00). Inmediatamente después del tratamiento ( $t=0$ ), el alimento previamente pesado se introdujo en los ratones y se midió la ingesta de alimento acumulativa pesando el resto del alimento después de  $t=1, 2, 4, 8, 12$  y 24 horas. En los ratones delgados jóvenes, el Compuesto 7 redujo de un modo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) la ingesta de alimento durante los periodos de tiempo de 0-4, 0-8, 0-12 y 0-24. La exendina-4 redujo de un modo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) la ingesta de alimento durante los periodos de tiempo de 0-2, 0-4, 0-8, 0-12 y 0-24. En los ratones obesos mayores, el Compuesto 7 redujo de un modo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) la ingesta de alimento durante los periodos de tiempo de 0-2, 0-4, 0-8, 0-12 y 0-24. La exendina-4 redujo de un modo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) la ingesta de alimento en todos los periodos de tiempo.

#### 45 **Ejemplo 11: efecto de la administración subcutánea del Compuesto 11, agonista de GluGLP-1, durante 3 semanas, sobre lípidos en ratones alimentados con una dieta rica en grasas durante 30 semanas.**

50 Efecto del tratamiento de ratones durante 3 semanas que habían estado alimentados con una Dieta Rica en Grasas durante 30 semanas antes del tratamiento (s.c.) con vehículo (PBS), exendina-4 10 nmol/kg o Compuesto 11 10 nmol/kg dos veces al día durante 3 semanas sobre lípidos (Figura 11). El efecto se midió sobre el LDL, HDL y triglicéridos (CHO: Colesterol Total; HDL: Colesterol de Alta Densidad; LDL: Colesterol de Baja Densidad; TRIG: Triglicéridos; HDL/LDL: relación entre HDL y LDL).

55 El Compuesto 11 disminuyó significativamente el colesterol, HDL, LDL ( $P < 0,001$ ) y significativamente los triglicéridos ( $P < 0,05$ ), mientras que la relación HDL/LDL aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) (Fig. 11). La relación HDL/LDL se considera como un indicador de riesgo de cardiopatía. A mayor relación, menor riesgo de infarto u otros problemas cardiovasculares.

#### 60 **Ejemplo 12: efecto del Compuesto 11 sobre la formación de AMPc en hepatocitos**

65 Todos los péptidos ensayados se comportaron como agonistas completos con respecto a la formación de AMPc estimulada por GluR, con la salvedad de la exendina-4 y la liraglutida, agonistas puros de GLP-1. En la Tabla puede observarse que el orden de clasificación de fuerza es: Compuesto 1 > glucagón > Compuesto 11 > oxintomodulina >>> exendina-4 y liraglutida (Tabla 9).

Finalmente, no se observó regulación negativa de la respuesta de la  $E_{MAX}$  del AMPc a altas concentraciones, lo cual difiere de lo observado en las células HEK293 que expresan hGluR.

**Tabla 9. Efecto de agonistas de glucagón sobre la formación de AMPc en cultivos primarios humanos.**

5

Péptido	Compuesto N <sup>o</sup>	GluR $CE_{50}$ (nM)		
		(1)	(2)	(pro log)
Exendina-4		$\infty$	$\infty$	$\infty$
Glucagón		2,1	7,7	4,0
Oxintomodulina		194,5	222,7	208,1
	1	1,4	2,2	1,8
	11	32,9	25,5	28,9
Liraglutida		$\infty$	$\infty$	$\infty$

**Ejemplo 13: peso hepático de ratones de control sanos C57 tratados durante 2 semanas**

10 El tratamiento repetido con agonistas dobles de GluGLP-1 acilados, de acción prolongada, tales como el Compuesto 11, no produjeron ningún cambio en el tamaño del hígado (dilatado o contraído) en comparación con los agonistas dobles de GluGLP-1 no acilados, Compuesto 1 (Figura 12).

**Ejemplo 14: HbA1c en ratones db/db después de 28 días**

15

Durante 4 semanas se trataron ratones diabéticos (db/db) con vehículo o con el Compuesto 11 y se determinó la HbA1c (Cobas® norma de aplicación: A1C-2) en muestras de sangre entera (20  $\mu$ l) extraídas de los ratones tratados. Los resultados se muestran en la Figura 13. Se calculó el valor  $\Delta$ HbA1c ( %) de cada ratón restando su HbA1c ( %) al inicio del tratamiento de la HbA1c ( %) a las 4 semanas. El tratamiento con el Compuesto 11 disminuyó significativamente el valor de  $\Delta$ HbA1c ( %). (P = 0,03; ensayo de la t de Student) en comparación con el vehículo.

20

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula

5  $R^1-Z-R^2$

en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;

$R^2$  es OH o  $NH_2$ ;

y Z es un péptido que tiene la fórmula I:

10 His-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-X16-X17-Ala-Ala-X20-  
X21-Phe-Val-X24-Trp-Leu-X27-X28-Ala-X30; (I)

en la que

15 X2 se selecciona de Aib o Ser;

X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;

X16 se selecciona de Arg y X;

X17 se selecciona de Arg y X;

20 X20 se selecciona de Arg, His y X;

X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y X;

X27 se selecciona de Leu y X;

X28 se selecciona de Arg y X;

25 X30 es X o está ausente;

en la que al menos uno de X16, X17, X20, X24, X27, X28 y X30 es X;

y en donde cada resto X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, Ser, Cys, Dbu, Dpr y Orn;

30 en donde la cadena lateral de al menos un resto X se conjuga con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i)  $Z^1$ , en donde  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o

(ii)  $Z^1Z^2$ , en donde  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  está conjugado con la cadena lateral de X mediante  $Z^2$ ;

35 con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA.

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

40 (a) uno o más de dichos restos de X se seleccionan independientemente de Lys, Glu o Cys; y/o

(b) X16 se selecciona de Glu, Lys y Ser;

X17 se selecciona de Lys y Cys;

X20 se selecciona de His, Lys, Arg y Cys;

45 X24 se selecciona de Lys, Glu y Ala;

X27 se selecciona de Leu y Lys; y/o

X28 se selecciona de Ser, Arg y Lys; y/o

(c) el péptido de fórmula I incluye uno o más de las siguientes combinaciones de restos:

50 X2 es Aib y X17 es Lys;

X2 es Aib y X17 es Cys;

X2 es Aib y X20 es Cys;

X2 es Aib y X28 es Lys;

55 X12 es Arg y X17 es Lys;

X12 es Leu y X17 es Lys;

X12 es Lys y X20 es Lys;

X12 es Lys y X17 es Lys;

X16 es Lys y X17 es Lys;

60 X16 es Ser y X17 es Lys;

X17 es Lys y X20 es Lys;

X17 es Lys y X21 es Asp;

X17 es Lys y X24 es Glu;

X17 es Lys y X27 es Leu;

65 X17 es Lys y X27 es Lys;

X17 es Lys y X28 es Ser;

X17 es Lys y X28 es Arg;  
 X20 es Lys y X27 es Leu;  
 X21 es Asp y X27 es Leu;  
 X2 es Aib, X12 es Lys y X16 es Ser;  
 5 X12 es Lys, X17 es Lys y X16 es Ser;  
 X12 es Arg, X17 es Lys y X16 es Glu;  
 X16 es Glu, X17 es Lys y X20 es Lys;  
 X16 es Ser, X21 es Asp y X24 es Glu;  
 10 X17 es Lys, X24 es Glu y X28 es Arg;  
 X17 es Lys, X24 es Glu y X28 es Lys;  
 X17 es Lys, X27 es Leu y X28 es Ser;  
 X17 es Lys, X27 es Leu y X28 es Arg;  
 X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu;  
 15 X20 es Lys, X27 es Leu y X28 es Ser;  
 X20 es Lys, X27 es Leu y X28 es Arg;  
 X16 es Ser, X20 es His, X24 es Glu y X27 es Leu;  
 X17 es Lys, X20 es His, X24 es Glu y X28 es Ser;  
 X17 es Lys, X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu; o  
 20 X17 es Cys, X20 es Lys, X24 es Glu y X27 es Leu.

3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el péptido de fórmula I contiene un solo aminoácido del tipo conjugado con el sustituyente lipófilo, en donde, por ejemplo, el péptido contiene un solo resto de Lys, un solo resto de Cys o un solo resto de Glu, y en donde el sustituyente lipófilo está conjugado con ese resto.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la secuencia peptídica de fórmula I comprende uno o más puentes intramoleculares, y en el que opcionalmente

(a) dicho puente intramolecular está formado entre las cadenas laterales de dos restos de aminoácidos que están separados por tres aminoácidos en la secuencia de aminoácidos lineal de fórmula I;  
 30 (b) el puente intramolecular está formado entre las cadenas laterales de los pares de restos 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24 o 24 y 28;  
 (c) el puente intramolecular es un puente salino o un anillo de lactama; y/o  
 (d) el puente intramolecular implica un par de restos en los que:

35 X16 es Glu y X20 es Lys;  
 X16 es Glu y X20 es Arg;  
 X16 es Lys y X20 es Glu; o  
 X16 es Arg y X20 es Glu;  
 40 X17 es Arg y X21 es Glu;  
 X17 es Lys y X21 es Glu;  
 X17 es Arg y X21 es Asp; o  
 X17 es Lys y X21 es Asp;  
 X20 es Glu y X24 es Lys;  
 45 X20 es Glu y X24 es Arg;  
 X20 es Lys y X24 es Glu; o  
 X20 es Arg y X24 es Glu;  
 X24 es Glu y X28 es Lys;  
 X24 es Glu y X28 es Arg;  
 50 X24 es Lys y X28 es Glu; o  
 X24 es Arg y X28 es Glu.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que al menos uno de X16, X17, X20 y X28 está conjugado con un sustituyente lipófilo.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que:

(a) X30 está ausente; o  
 (b) X30 está presente y está conjugado con un sustituyente lipófilo.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que:

(a) el compuesto tiene un solo sustituyente lipófilo, en la posición 16, 17, 20, 24, 27, 28 o 30, preferentemente en la posición 16, 17 o 20, particularmente en la posición 17;  
 65 (b) el compuesto tiene exactamente dos sustituyentes lipófilos, cada uno en una de las posiciones 16, 17, 20, 24, 27, 28 o 30; o  
 (c) el compuesto tiene sustituyentes lipófilos en las posiciones 16 y 17, 16 y 20, 16 y 24, 16 y 27, 16 y 28 o 16 y

30; en 17 y 20, 17 y 24, 17 y 27, 17 y 28 o 17 y 30; en las posiciones 20 y 24, 20 y 27, 20 y 28 o 20 y 30; en las posiciones 24 y 27, 24 y 28 o 24 y 30; en las posiciones 27 y 28 o 27 y 30; o en las posiciones 28 y 30.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:

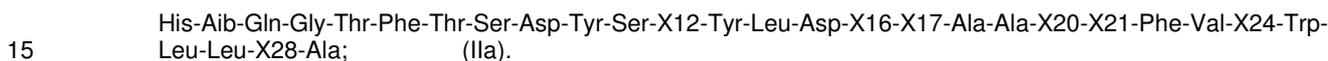


en la que  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-4}$ , acetilo, formilo, benzilo o trifluoroacetilo;

$R^2$  es OH o  $NH_2$ ;

10 y Z es un péptido que tiene:

(a) la fórmula IIa;



en la que

20 X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;

X16 se selecciona de Ser y X;

X17 es X;

X20 se selecciona de His y X;

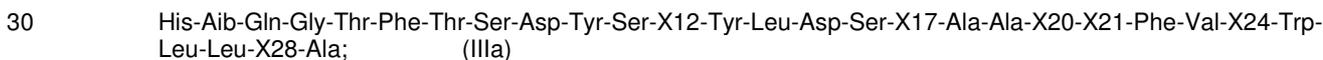
X21 se selecciona de Asp y Glu;

25 X24 se selecciona de Ala y Glu;

X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

y en la que cada resto X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, y Cys;

(b) la fórmula IIIa;



en la que

35 X12 se selecciona de Lys y Arg;

X17 es X;

X20 se selecciona de His y X;

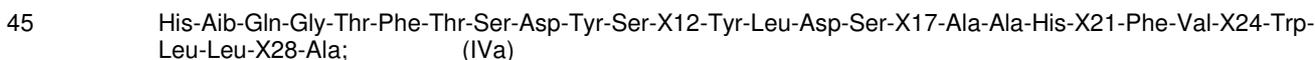
X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y Glu;

40 X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

y en la que cada resto X se selecciona independientemente de Glu, Lys y Cys; o

(c) la fórmula IVa;



en la que

50 X12 se selecciona de Lys y Arg;

X17 es X;

X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y Glu;

X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

55 en donde X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;

en donde la cadena lateral de al menos un resto X está conjugado con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i)  $Z^1$ , en donde  $Z^1$  es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o

60 (ii)  $Z^1Z^2$ , en donde  $Z^1$  es un residuo lipófilo,  $Z^2$  es un espaciador y  $Z^1$  está conjugado con la cadena lateral de X mediante  $Z^2$ .

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



en la que R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-4</sub>, acetilo, formilo, benzilo o trifluoroacetilo;  
R<sup>2</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
y Z es un péptido que tiene:

5 (a) la fórmula IIb;

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-X16-X17-Ala-Ala-X20-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
Leu-Leu-X28-Ala; (IIb)

10 en la que

X12 se selecciona de Lys, Arg y Leu;

X16 se selecciona de Ser y X;

X17 es X;

15 X20 se selecciona de His y X;

X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y Glu;

X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

y en donde cada resto X se selecciona independientemente del grupo que consiste en Glu, Lys, y Cys;

20

(b) la fórmula IIIb;

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-Ser-X17-Ala-Ala-X20-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
Leu-Leu-X28-Ala; (IIIb)

25

en la que

X12 se selecciona de Lys o Arg;

X17 es X;

30 X20 se selecciona de His y X;

X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y Glu;

X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

y en donde cada resto X se selecciona independientemente de Glu, Lys y Cys; o

35

(c) la fórmula IVb;

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-X12-Tyr-Leu-Asp-Ser-X17-Ala-Ala-His-X21-Phe-Val-X24-Trp-  
Leu-Leu-X28-Ala; (IVb)

40

en la que

X12 se selecciona de Lys y Arg;

X17 es X;

45 X21 se selecciona de Asp y Glu;

X24 se selecciona de Ala y Glu;

X28 se selecciona de Ser, Lys y Arg;

en donde X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;

50 en la que la cadena lateral de al menos un resto X está conjugada con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i) Z<sup>1</sup>, en donde Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o

(ii) Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>, en donde Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo, Z<sup>2</sup> es un espaciador y Z<sup>1</sup> está conjugado con la cadena lateral de X mediante Z<sup>2</sup>.

55

con la condición de que Z no sea HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-γ-Glu)-AAHDFVEWLLRA.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el péptido de fórmula I, IIa, IIIa, IVa, IIb, IIIb o IVb tiene las secuencias:

60

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDKKAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLKRA;

65

HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLKA;

HSQGTFTSDYSRYLDSKAAHDFVEWLLRA;

HSQGTFTSDYSLYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRAK;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSAK  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLKSA;  
 5 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVKWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAACDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDKSAHDFVEWLLRA;  
 10 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSAK;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA;  
 15 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLKA  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAKDFVAWLLSA  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVAWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDKKAHDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSRYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 20 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVKWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSLYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAACDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()KAAE()DFVEWLLRA;  
 25 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVE()WLLK()A  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAK()DFVE()WLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK()AAHE()FVEWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK()AAKE()FVEWLLRA; o  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;  
 30 HSQGTFTSDYSKYLD-K\*-KAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K\*-RA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K\*-A;  
 HSQGTFTSDYSRYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;  
 35 HSQGTFTSDYSLYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLRA-K\*;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA-K\*;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K\*-SA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K\*-WLLRA;  
 40 HSQGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-C\*-DFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLD-K\*-SAAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 45 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLLSA-K\*;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K\*-A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLRA;  
 50 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K\*-AAHDFVEWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K\*-DFVAWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVAWLL-K\*-A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K\*-KAAHDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSRYLDS-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 55 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K\*-WLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSLYLDS-K\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-C\*-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-C\*-DFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-S\*-KAAHDFVEWLLSA;  
 60 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDK()K\*AAE()DFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK\*AAHDFVE()WLLK()A  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK\*AAK()DFVE()WLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK()AAHE()FVEWLLK\*A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSK()AAK\*E()FVEWLLRA.  
 65 Indicando el "\*" la posición de un sustituyente lipófilo.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que:

(a)  $Z^1$  comprende una cadena hidrocarbonada que tiene de 10 a 24 átomos de C, de 10 a 22 átomos de C, o de 10 a 20 átomos de C, por ejemplo, en donde  $Z^1$  es un residuo de dodecanoilo, 2-butiloctanoilo, tetradecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo o eicosanoilo;

(b)  $Z^2$  es, o comprende, uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo, en donde  $Z^2$  es un resto de  $\gamma$ -Glu, Glu,  $\beta$ -Ala o  $\epsilon$ -Lys, o un residuo de 3-aminopropanoilo, 4-aminobutanoilo, 8-aminooctanoilo u 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo; y/o

(c) en donde el sustituyente lipófilo se selecciona del grupo que consiste en dodecanoil- $\gamma$ -Glu, Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu, Hexadecanoil-Glu, Hexadecanoil-[3-aminopropanoilo], Hexadecanoil-[8-aminooctanoilo], Hexadecanoil- $\epsilon$ -Lys, 2-butiloctanoil- $\gamma$ -Glu, Octadecanoil- $\gamma$ -Glu y Hexadecanoil-[4-aminobutanoilo].

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11 en el que Z tiene las fórmulas:

HSQGTFTSDYSKYLD-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-KAAHDFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-RA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-DFVEWLLRA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFVEWLL-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-A;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLKA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVE(WLLK)A;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-DFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Dodecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[3-aminopropanoilo])-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[8-aminooctanoilo])-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\epsilon$ -Lys)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K([2-butiloctanoil]- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[4-aminobutanoilo])-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 HSQGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(hexadecanoil)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([2-butiloctanoil]- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-[4-aminobutanoilo])-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Octadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLLSA; o  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-E)-AAHDFVEWLLSA;  
 en donde los restos marcados con “()” participan en un enlace intramolecular; o

en el que Z tiene las fórmulas:

H-Aib-QGTFTSDYS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-YLDSKAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYS KYLD-K(Hexadecanoil-isoGlu)-KAAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAA-K(Hexadecanoil-isoGlu)-DFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSKAAHDFV-K(Hexadecanoil-isoGlu)-WLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoLys)-AARDFVAWLLRA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHEFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAEDFVEWLLSA;  
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA.

13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil- $\gamma$ -Glu)-AAHDFVEWLL-SA-NH<sub>2</sub>.

14. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-4</sub>, acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;  
R<sup>2</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;  
y Z es un péptido que tiene:

5 (a) la fórmula V

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-X17 -Ala-Ala-His-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-  
Leu-Leu-X28; (V)

10 en la que

X17 es X  
X28 es Ser o está ausente; o

15 (b) la fórmula VI:

His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-X17-Ala-Ala-His-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-  
Leu-Leu-Ser-Ala; (VI)

20 en la que

X17 es X;

25 en donde X se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys y Cys;  
y en donde la cadena lateral de X está conjugada con un sustituyente lipófilo que tiene la fórmula:

(i) Z<sup>1</sup>, en donde Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral de X; o  
(ii) Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>, en donde Z<sup>1</sup> es un residuo lipófilo, Z<sup>2</sup> es un espaciador y Z<sup>1</sup> está conjugado con la cadena lateral de X mediante Z<sup>2</sup>;

30 15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 14 en el que Z tiene las fórmulas:

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLS;  
H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLL; o  
35 H-Aib-EGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA.

40 16. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o una sal o derivado del mismo, en mezcla con un vehículo, por ejemplo, en donde la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en un método de tratamiento médico, por ejemplo

(a) para su uso en la prevención de aumento de peso o para promover la pérdida de peso;  
45 (b) para su uso en un método para mejorar los niveles de glucosa en circulación, la tolerancia a la glucosa y/o los niveles de colesterol en circulación, disminuir los niveles de LDL en circulación y/o aumentar la relación HDL/LDL; o  
(c) para su uso en un método de tratamiento de una afección causada o **caracterizada por** sobrepeso, por ejemplo, el tratamiento y/o la prevención de obesidad, obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula relacionada con la obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, síndrome metabólico, prediabetes, resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad de la  
50 arteria periférica, ictus o enfermedad microvascular.

55 18. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 en donde el compuesto es para administración como parte de una terapia de combinación con un agente para el tratamiento de la diabetes, obesidad, dislipidemia o hipertensión.

60 19. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que el agente para el tratamiento de la diabetes es metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona, insulina o un análogo de insulina.

65 20. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que el agente para tratamiento de la obesidad es un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón, el péptido YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor canabinoide 1, un inhibidor de lipasa, un agonista del receptor 4 de melanocortina o un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina.

21. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que el agente para tratamiento de la hipertensión es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de angiotensina II, un diurético, un beta bloqueante o un bloqueante de los canales de calcio.
- 5 22. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que el agente para el tratamiento de la dislipidemia es una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.
23. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para:
- 10 (a) prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso en un individuo que lo necesite;
- (b) mejorar los niveles de glucosa en circulación, la tolerancia a la glucosa y/o los niveles de colesterol en circulación, reducir los niveles de LDL en circulación y/o aumentar la relación HDL/LDL en un individuo que lo necesite; o
- 15 (c) tratamiento de una afección ocasionada o **caracterizada por** sobrepeso, por ejemplo, el tratamiento y/o la prevención de obesidad, obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula relacionada con obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, prediabetes, resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad de la arteria periférica, ictus o enfermedad microvascular en un individuo que lo necesite.
- 20 24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23 en el que el compuesto es para administración como parte de una terapia de combinación con un agente para tratamiento de diabetes, obesidad, dislipidemia o hipertensión, por ejemplo
- 25 (a) en donde el agente para el tratamiento de la diabetes es metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona, insulina o un análogo de insulina;
- (b) en donde el agente para el tratamiento de la obesidad es un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón, el péptido YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor 1 canabinoide, un inhibidor de 30 lipasa, un agonista del receptor 4 de melanocortina o un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina.
- (c) en donde el agente para tratamiento de la hipertensión es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de angiotensina II, diuréticos, un beta bloqueante o un bloqueante de los canales de calcio; o
- 35 (d) en donde el agente para el tratamiento de la dislipidemia es una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.

Figura 1.

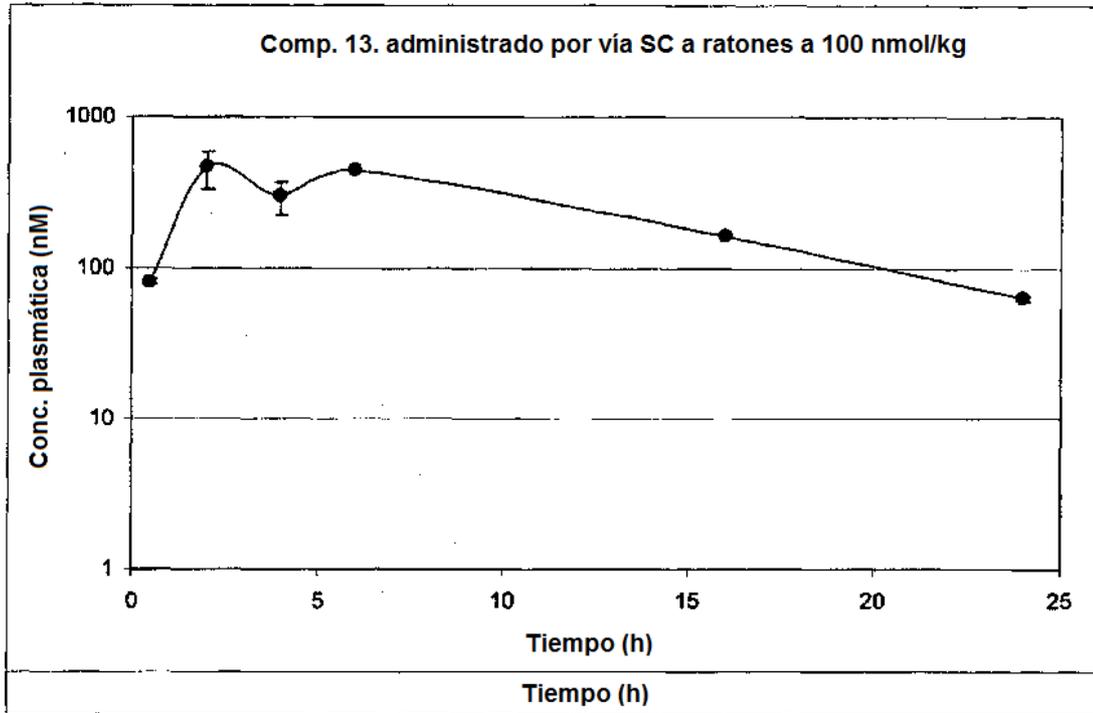


Figura 2.

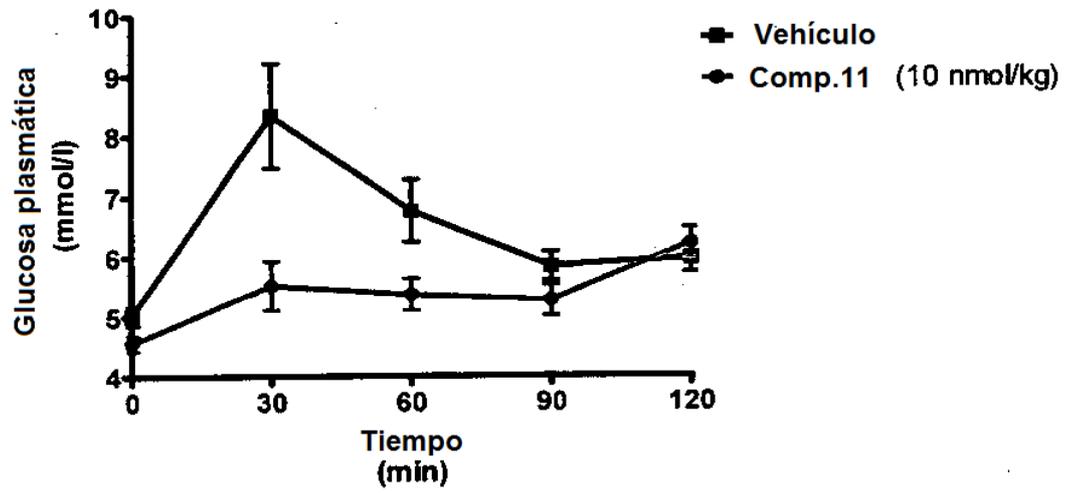


Figura 3.

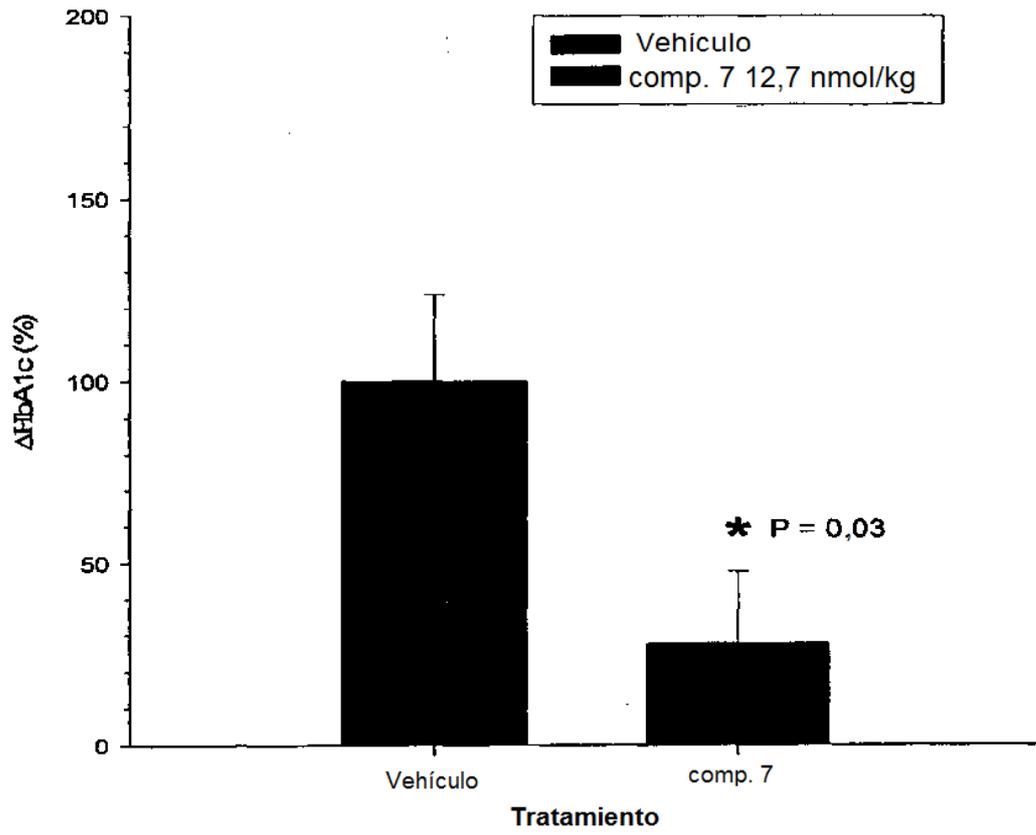


Figura 4.

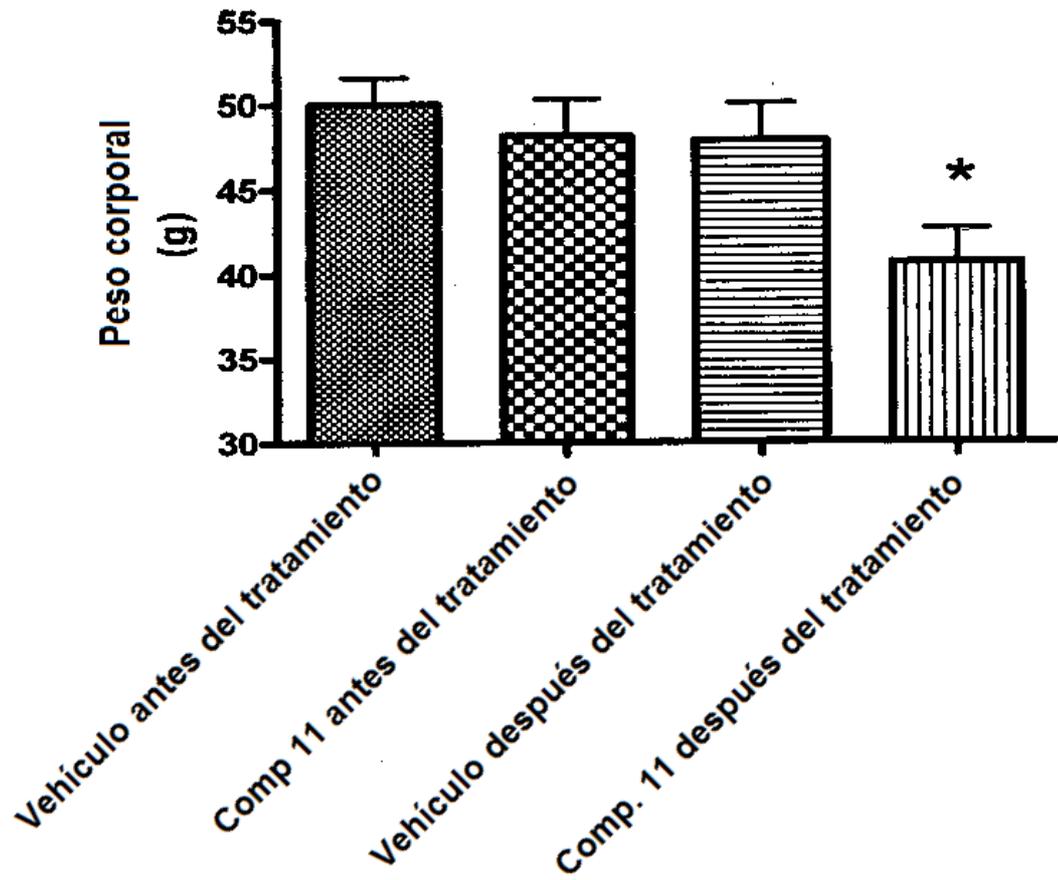


Figura 5.

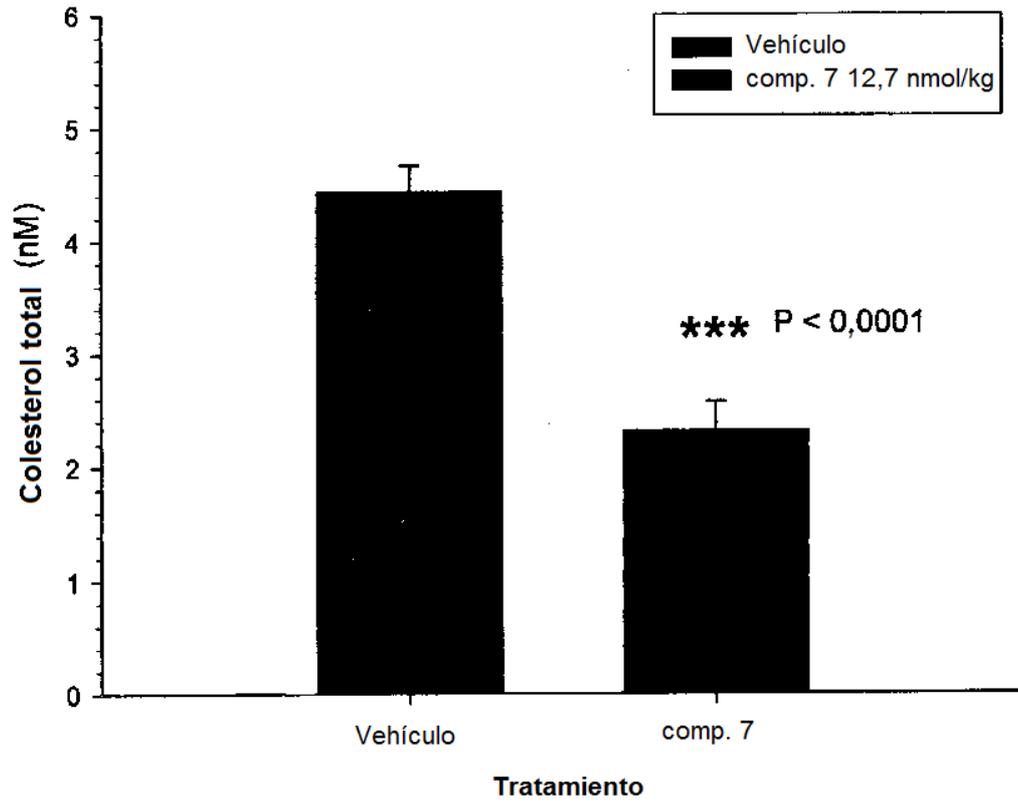


Figura 6.

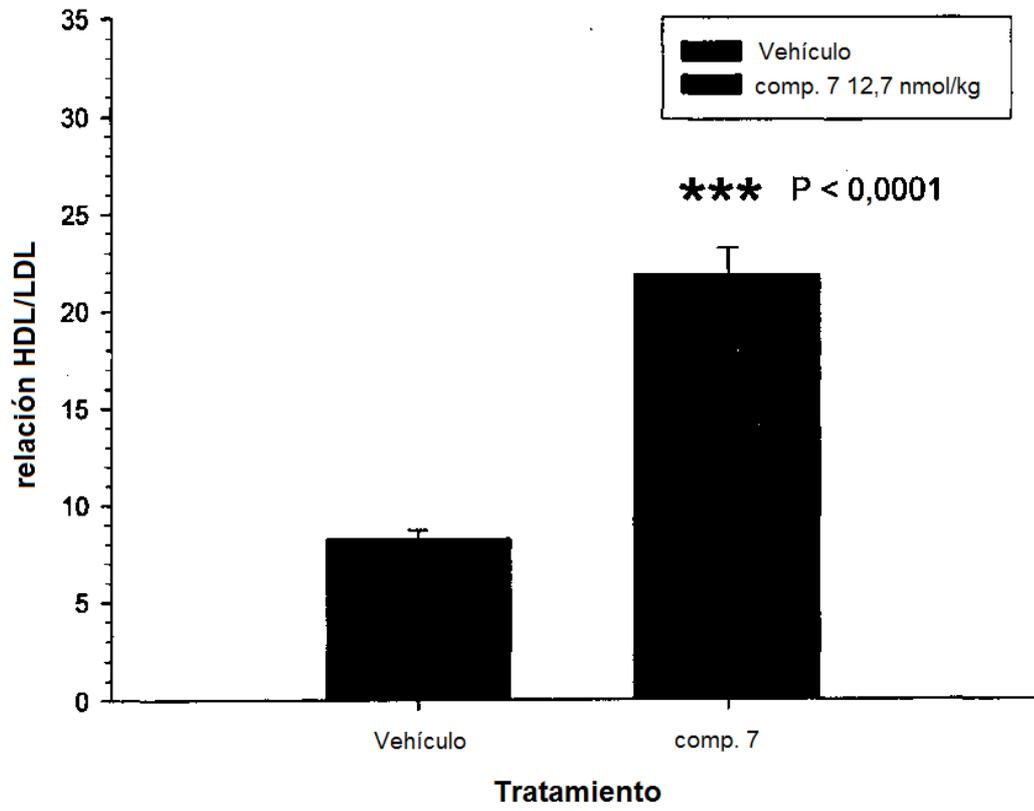


Figura 7.

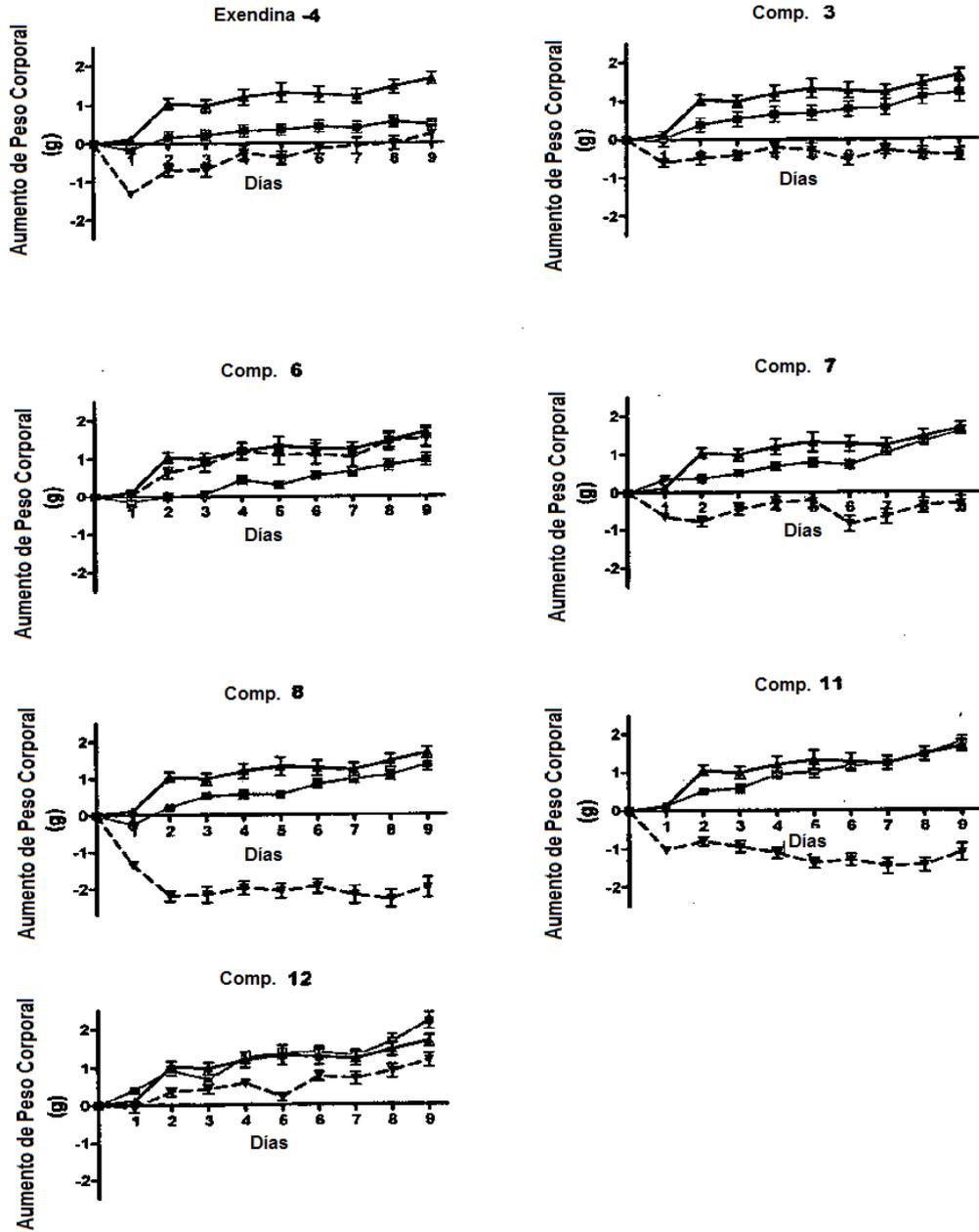


Figura 8.

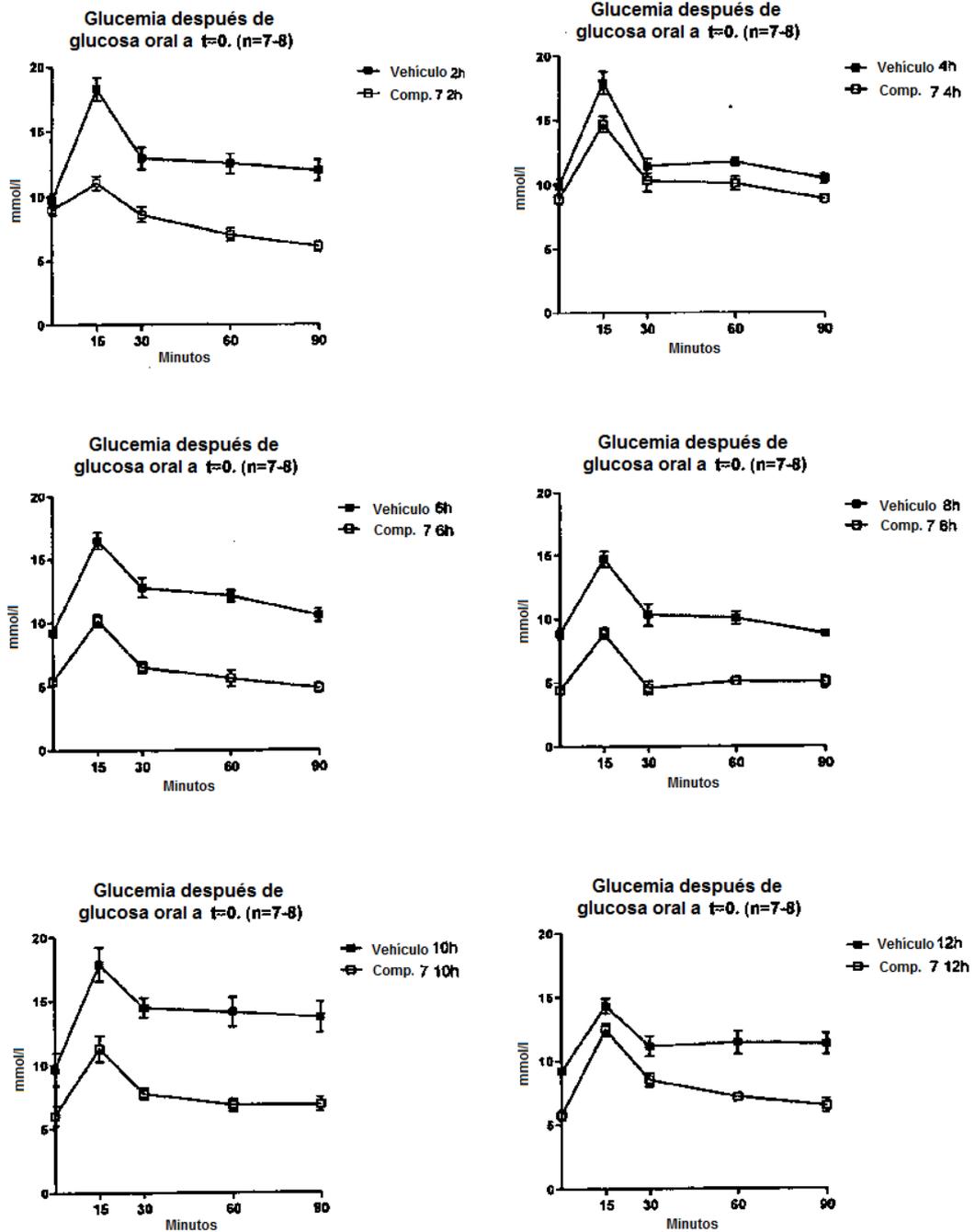


Figura 9.

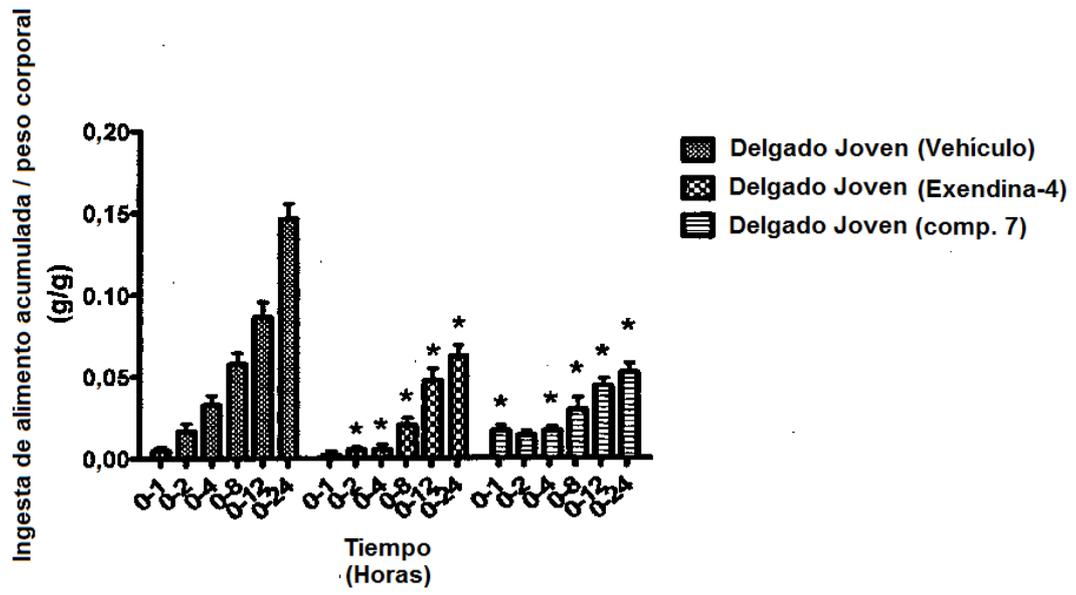


Figura 10.

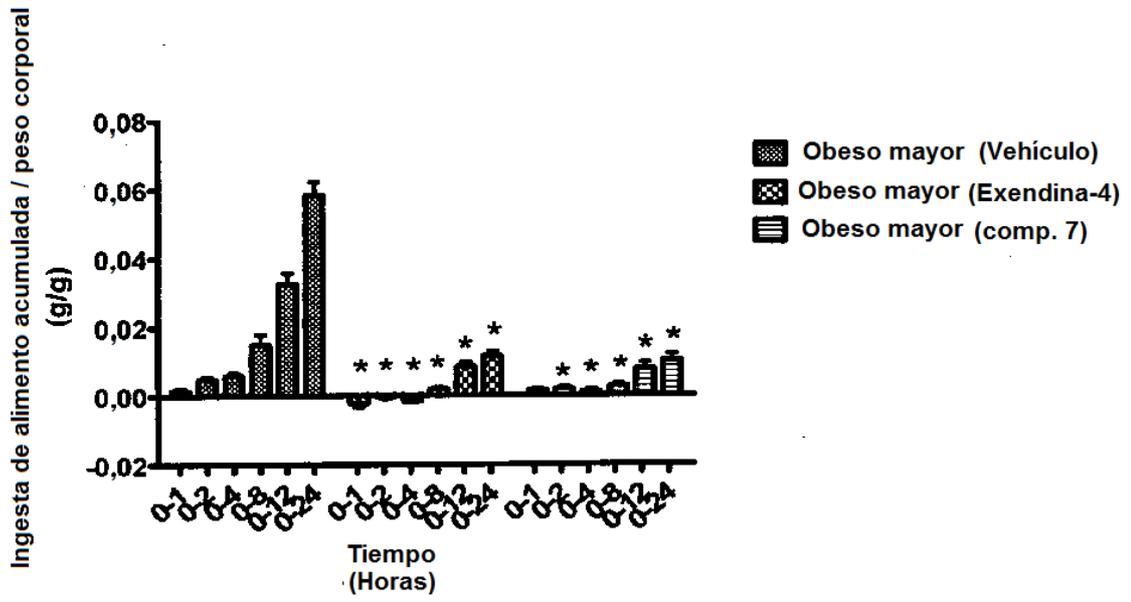


Figura 11.

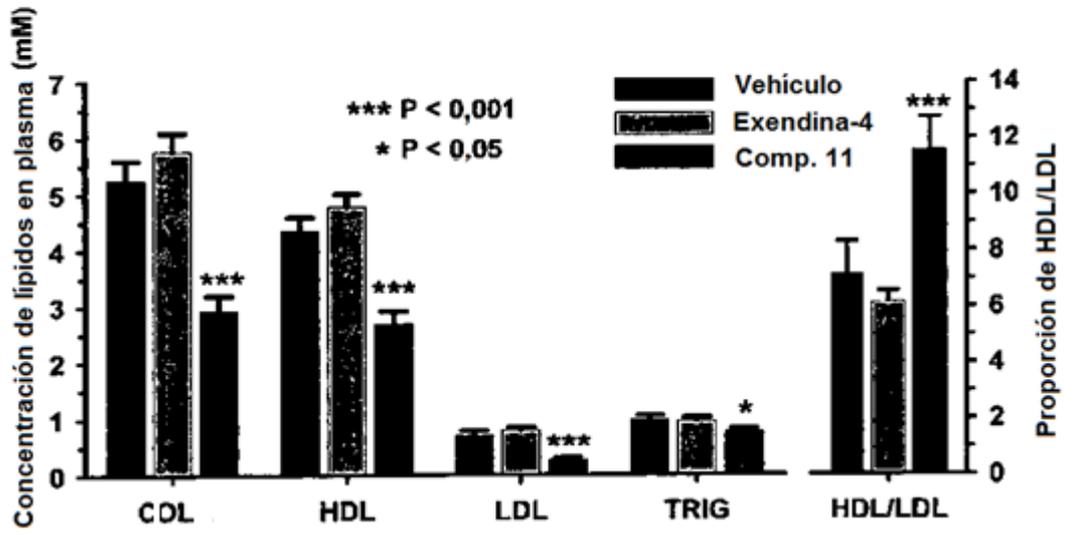


Figura 12.

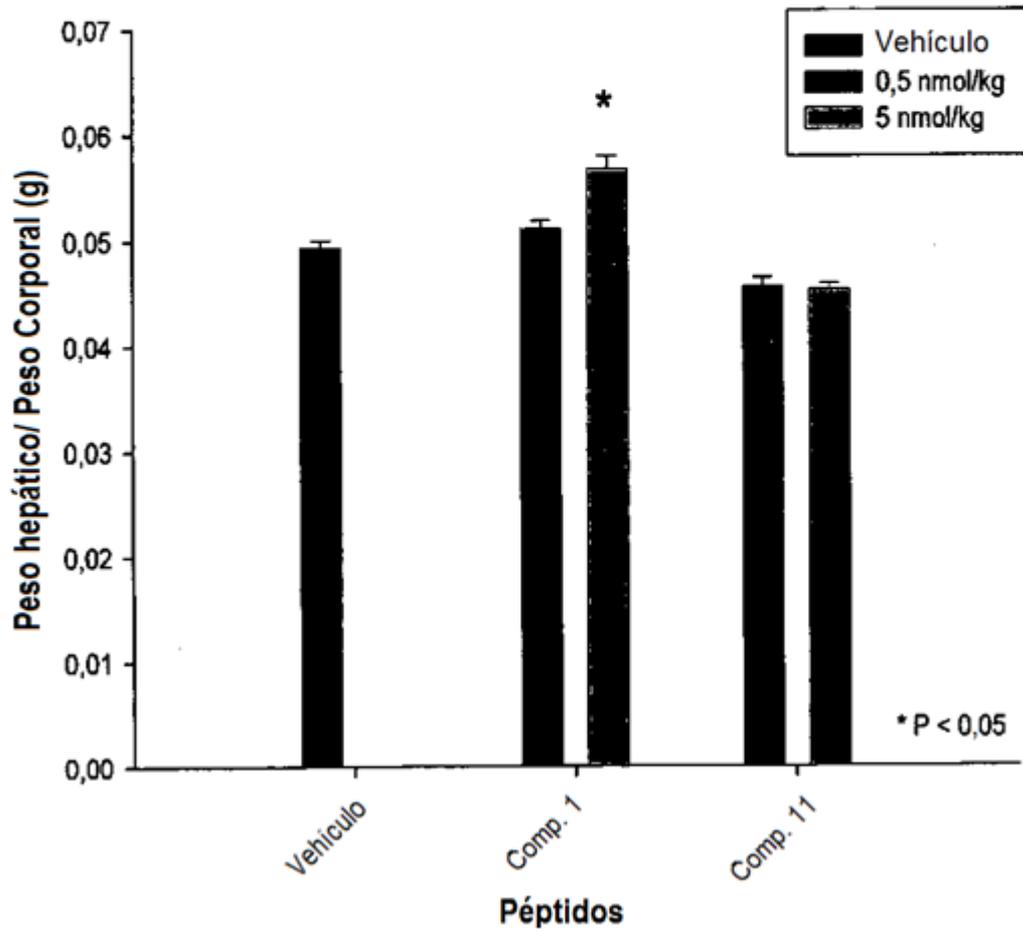


Figura 13.

