

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 228**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 10176012 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2289560**

54 Título: **Marcas de prolongación polipeptídica que comprenden un resto de tetrazol**

30 Prioridad:

08.07.2004 DK 200401083

18.03.2005 EP 05102167

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

03.08.2015

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Corporate Patents, Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**DÖRWALD, FLORENCIO ZARAGOZA;
SCHIØDT, CHRISTINE BRUUN;
KRUSE, THOMAS y
MADSEN, KJELD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 542 228 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

Marcas de prolongación polipeptídica que comprenden un resto de tetrazol

Campo de la invención

5 La presente invención desvela compuestos que comprenden un bioisótero de ácido carboxílico heterocíclico, procedimientos para preparar los compuestos y las aplicaciones médicas de dichos compuestos.

Antecedentes de la invención

10 A menudo es deseable mantener concentraciones bien definidas de un compuesto dado en el torrente sanguíneo durante un tiempo largo. Este sería el caso, por ejemplo, cuando se administra un inmunógeno y se desea una respuesta inmune fuerte, o cuando tiene que exponerse una diana terapéutica de forma continua a un agente terapéutico durante un tiempo largo. Actualmente no existen estrategias universalmente aplicables para potenciar la semi-vida en plasma de ningún tipo de compuesto. La cantidad de polipéptidos endógenos conocidos con actividades biológicas interesantes está creciendo rápidamente, también como resultado de la exploración en curso del genoma humano. Debido a sus actividades biológicas, muchos de estos polipéptidos en principio podrían usarse como agentes terapéuticos. Los péptidos endógenos, sin embargo, no siempre son adecuados como candidatos de fármaco porque estos péptidos a menudo tienen semi-vidas de pocos minutos debido a la rápida degradación por peptidasas y/o debido a la filtración renal y la excreción en la orina. La semi-vida de polipéptidos en plasma humano varía fuertemente (desde unos pocos minutos hasta más de una semana). Asimismo, la semi-vida de fármacos de molécula pequeña también es muy variable. La razón para esta fuerte variabilidad de semi-vidas en plasma de péptidos, proteínas, u otros compuestos, sin embargo, no está bien comprendida.

20 La albúmina sérica tiene una semi-vida de más de una semana y un enfoque para aumentar la semi-vida en plasma de los péptidos ha sido derivatizar los péptidos con una entidad química que se une a albúmina sérica.

Knudsen y col. (J. Med. Chem. 2000, 43, 1664-1669) han mostrado que péptidos GLP-1 acilados muestran alta potencia de receptor y un aumento de diez veces de la semi-vida en plasma en cerdos.

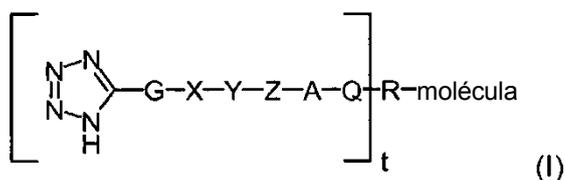
25 Zobel y col. (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003, 13, 1513-1515) han demostrado que la semi-vida en plasma de un péptido anti-coagulante en conejos aumentaba en 10-50 veces por derivatización del extremo amino con éster de fosfato basado en moléculas pequeñas que se unen a albúmina sérica. El documento WO 0041548 A2 desvela exendina-4 conjugada a PEG.

Sumario de la invención

30 De acuerdo con la presente invención se desvela un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula con un bioisótero de ácido carboxílico heterocíclico.

La presente invención también desvela un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula con un 1H-tetrazol.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende convertir dicha molécula en un compuesto de fórmula general (I):



35

en la que

G, X e Y representan independientemente un enlace, -S-, -O-, -NH-, $-(\text{CH}_2)_{1-10}$, o

arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

40 heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

$-(\text{CH}_2)_n$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, $-(\text{CF}_2)_n$, $-\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_n$, $-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_n$, en los que n es 1-40 y

A representa

-C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, o
-O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)- y

Q representa un enlace o

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, o

5 -O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, o

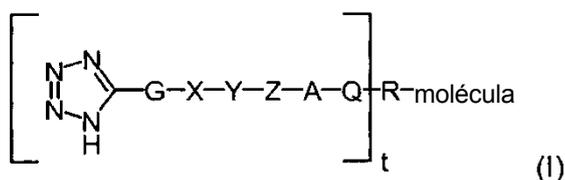
-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

R representa un enlace o un poli-radical, tal como [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅ y

t es 1-40 y

el término 'molécula' se define como en la presente reivindicación 1.

10 La presente invención por tanto proporciona compuestos de fórmula general (I):



en la que

G, X e Y representan independientemente un enlace, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, o

15 arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂-(CF₂)_n-, en los que n es 1-40 y

20 A representa

-C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, o
-O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)- y

Q representa un enlace o

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, o

25 -O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, o

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

R representa un enlace o un poli-radical, tal como [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅ y

t es 1-40 y

el término "molécula" se define como en la presente reivindicación 1.

30 La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que G, X e Y son todos un enlace.

La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que G, X e Y se seleccionan todos de -(CH₂)₁₋₁₀-.

La presente invención también proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que t es 1.

35 **Definiciones**

En la presente memoria descriptiva, los siguientes términos tienen el significado indicado:

El término "poli-radical" significa una molécula o resto molecular con más de un electrón no compartido. Un poli-radical de acuerdo con esta definición puede usarse para unir covalentemente dos o más (mono-)radicales juntos.

La expresión "fármaco de molécula pequeña" significa un agente terapéutico con un peso molecular < 1500 g/mol.

- 5 La expresión "agente terapéutico" significa un péptido, proteína, fármaco de molécula pequeña, o cualquier otro tipo de compuesto, capaz de provocar una respuesta biológica.

La expresión "semi-vida en plasma" significa el tiempo necesario para que la concentración de un compuesto dado presente en el plasma de un mamífero vivo, tal como un ser humano, disminuya a la mitad de su concentración original.

- 10 El término "análogo" se refiere a un polipéptido en que menos del 30 % de los aminoácidos del polipéptido original se han retirado o reemplazado por otros aminoácidos (incluyendo aminoácidos estereoisoméricos, no naturales o modificados químicamente) o se han modificado químicamente, por ejemplo por acilación o alquilación de la cadena lateral. El término "análogo" también se refiere a polipéptidos en que el grupo amino N-terminal se ha retirado, alquilado con alquilo inferior, o acilado con ácidos alcanóico inferior, arilalcanoico, heteroarilalcanoico, o benzoico.
- 15 El término "análogo" también incluye polipéptidos en que el grupo carboxilo C-terminal se ha retirado o convertido en una amida por condensación con amoniaco, aminas de alquilo inferior, aminas de dialquilo inferior, aziridina, azetidina, pirrolidina, piperidina, o azepina. El término "análogo" también incluye polipéptidos en que se han reducido las funcionalidades disulfuro entre dos o más grupos de cisteína o se ha modificado la conectividad entre dos o más grupos de cisteína.

- 20 El término "derivado" como se usa en el presente documento en relación a un péptido significa un péptido modificado químicamente o un análogo del mismo, en el que al menos un sustituyente no está presente en el péptido no modificado o un análogo del mismo, es decir, un péptido que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres. Un ejemplo de un derivado de GLP-1 (7-37) es Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37).

- 25 La expresión "aminoácido no natural" se refiere a cualquier compuesto que comprenda al menos un grupo amino primario o secundario y al menos un grupo carboxilo, sin ser L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-glutamina, L-ácido glutámico, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, o L-valina.

- 30 El término "GLP-1 (7-37)" se refiere a un péptido con la secuencia de aminoácidos HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-GRG (SEQ ID N.º: 1).

La expresión "péptido GLP-1" como se usa en el presente documento significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1. En una realización el péptido GLP-1 es un agente insulínico.

- 35 El término "exendina-4(1-39)" se refiere a un péptido con la secuencia de aminoácidos HEGTFTSDLSKQMEEEA-VRLFIEWLKNKGGPSSGAPPPS (SEQ ID N.º: 2).

La expresión "agente insulínico" como se usa en el presente documento significa un compuesto que es un agonista de un receptor de GLP-1 humano, es decir, un compuesto que estimula la formación de AMPc en un medio adecuado que contiene el receptor de GLP-1 humano. La potencia de un agente insulínico se determina calculando el valor de CE₅₀ a partir de la curva de respuesta a dosis como se describe a continuación.

- 40 Se cultivaron células renales de cría de hámster (BHK) que expresan el receptor clonado de GLP-1 humano (BHK-467-12A) en medio DMEM con la adición de 100 UI/ml de penicilina, 100 µl/ml de estreptomina, 10 % de suero de ternera fetal y 1 mg/ml de Geneticina G-418 (Life Technologies). Se prepararon membranas plasmáticas por homogeneización en tampón (Tris-HCl 10 mM, NaCl 30 mM y ditiotretol 1 mM, pH 7,4, que contiene, además, 5 mg/l de leupeptina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 5 mg/l de pepstatina (Sigma), 100 mg/l de bacitracina (Sigma) y 16
- 45 mg/l de aprotinina (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA). El homogenado se centrifugó sobre la parte superior de una capa de sacarosa al 41 % p/v. La banda blanca entre las dos capas se diluyó en tampón y se centrifugó. Las membranas plasmáticas se almacenaron a -80 °C hasta usarse.

- El ensayo de receptor funcional se realizó midiendo el AMPc como una respuesta a la estimulación por el agente insulínico. Se realizó incubación en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 µl y con las siguientes concentraciones finales: Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgSO₄ 1,5 mM, ATP 1,7 mM, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 2 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 7,4. Los compuestos a ensayar para la actividad agonista se disolvieron y diluyeron en tampón. Se preparó de forma reciente GTP para cada experimento: se añadieron 2,5 µg de membrana a cada pocillo y la mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de HCl 0,5 M. El AMPc formado se midió mediante ensayo de proximidad de centelleo (RPA 542, Amersham, RU). Se representaron las curvas de
- 55

respuesta a dosis para los compuestos individuales y se calcularon los valores de CE₅₀ usando el software GraphPad Prism.

5 La expresión "protegido de DPP-IV" como se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido significa un polipéptido que se ha modificado químicamente para volver a dicho compuesto resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). La enzima DPP-IV en plasma es conocida por estar implicada en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ejemplo, GLP-1, GLP-2, Exendina-4 etc. Por tanto, se está haciendo un esfuerzo considerable por desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos susceptible a hidrólisis mediada por DPP-IV para reducir la tasa de degradación por DPP-IV.

10 La resistencia de un péptido a degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el siguiente ensayo de degradación:

15 Se incuban alícuotas del péptido (5 nmol) a 37 °C con 1 µl de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 ml de tampón trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de 5 µl de ácido trifluoroacético al 10 % y los productos de degradación peptídica se separan y cuantifican usando análisis de HPLC. Un procedimiento para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican en una columna Vydac C18 widepore (poros de 30 nm, partículas de 5 mm) de 250 x 4,6 mm y se eluyen a un caudal de 1 ml/min con gradientes lineales por etapas de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % (acetonitrilo al 0 % durante 3 min, acetonitrilo al 0-24 % durante 17 min, acetonitrilo al 24-48 % durante 1 min) de acuerdo con Siegel y col., Regul. Pept. 1999; 79: 93-102 y Mentlein y col. Eur. J. Biochem. 1993; 214: 829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden controlarse mediante su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos) y se cuantifican por integración de sus áreas de pico respecto a las de los patrones. La tasa de hidrólisis de un péptido por dipeptidil aminopeptidasa IV se estima a tiempos de incubación que provocan que se hidrolice menos del 10 % del péptido.

La expresión "factor VII" se refiere al factor VII humano de la cascada de coagulación sanguínea.

25 El término "bioisótero" se refiere a un fragmento molecular capaz de imitar las propiedades biológicas de otro fragmento molecular. Los bioisóteros típicos de ácidos carboxílicos incluyen tetrazoles, fenoles, N-acilsulfonamidas, u otros compuestos con un grupo ácido NH- u OH-.

El término "halógeno" significa F, Cl, Br o I.

El término "alquilo" como se usa en el presente documento pretende indicar alquilo C₁-C₁₀ lineal, ramificado, o cíclico. La expresión "alquilo inferior" se refiere a alquilo C₁-C₆.

30 El término "arilo" como se usa en el presente documento pretende incluir sistemas de anillos aromáticos carbocíclicos tales como fenilo, bifenilo, naftilo, antraceno, fenantrenilo, fluorenilo, indenilo, pentalenilo, azuleno y similares. Arilo también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas carbocíclicos enumerados anteriormente. Ejemplos no limitantes de dichos derivados parcialmente hidrogenados son 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1,4-dihidronaftilo y similares.

35 El término "arileno" como se usa en el presente documento pretende incluir di-radicales derivados de areno tales como 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, 1,2-naftileno, 1,4-naftileno, 4,4'-bifenileno, 4,4'-terfenileno, 4,4'-cuaterfenileno.

40 El término "heteroarileno" como se usa en el presente documento pretende incluir di-radicales derivados de heteroareno, tales como 1,2,4-pirazol-2,5-diilo, imidazol-1,2-diilo, tiazol-2,4-diilo y similares, así como combinaciones de arileno con di-radicales de heteroarileno, tales como (4-fenilimidazol)-4,1'-diilo, (3,5-difenil-1,2,4-oxadiazol)-4,4"-diilo.

El término "ariloxi" como se usa en el presente documento se refiere al radical -O-arilo donde arilo es como se ha definido anteriormente. Ejemplos no limitantes son fenoxi, naftoxi, antracenoiloxi, fenantreniloxi, fluoreniloxi, indeniloxi.

45 El término "heteroarilo" como se usa en el presente documento pretende incluir sistemas de anillos aromáticos heterocíclicos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre tales como furilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, piranilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tetrazolilo, tiadiazinilo, indolilo, isoindolilo, benzofurilo, benzotienilo, indazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, purinilo, quinazolinilo, quinolizino, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalino, naftiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, azepinilo, diazepinilo, acridinilo y similares. Heteroarilo también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas heterocíclicos enumerados anteriormente. Ejemplos no limitantes de dichos derivados parcialmente hidrogenados son 2,3-dihidrobenzofuranilo, pirrolinilo, pirazolinilo, indanilo, indolinilo, oxazolidinilo, oxazolinilo, oxazepinilo.

55 Algunos de los términos definidos anteriormente pueden aparecer en más de una ocasión en las fórmulas

estructurales y a partir de dicha aparición cada término deberá definirse independientemente del otro.

La expresión "opcionalmente sustituido" como se usa en el presente documento, significa que los grupos en cuestión no están sustituidos o están sustituidos con uno o más de los sustituyentes especificados. Si los grupos en cuestión están sustituidos con más de un sustituyente los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

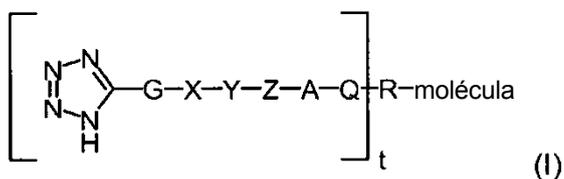
5 **Descripción detallada de la invención**

Descripción detallada de las divulgaciones

1. Un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula con un bioisómero de ácido carboxílico heterocíclico.

10 2. Un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula con un 1H-tetrazol.

3. Un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende convertir dicha molécula en un compuesto de fórmula general (I):



en la que

15 G, X e Y representan independientemente

un enlace, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₅-, -C(O)NH-, o

arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

20 heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂-(CF₂)_n-, en los que n es 1-40 y

A representa

-C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, o

25 -O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)- y

Q representa un enlace o

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, o

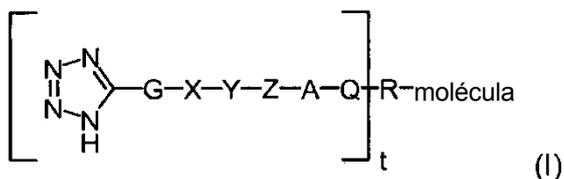
-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, o

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

30 R representa un enlace o un poli-radical, tal como [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅ y t es 1-40 y

el término 'molécula' se refiere a un compuesto que comprende un grupo amino o un grupo mercapto, al cual puede unirse covalentemente un grupo A o Q.

4. Un compuesto de fórmula general (I):



en la que

G, X e Y representan independientemente un enlace, -S-, -O-, -NH-, $-(CH_2)_{1-10}$ -, o

arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

- 5 heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

$-(CH_2)_n$ -, $-O-(CH_2)_n$ -, $-S-(CH_2)_n$ -, $-(OCH_2CH_2)_n$ -, $-(CF_2)_n$ -, $-O-CH_2-(CF_2)_n$ -, $-S-CH_2-(CF_2)_n$ -, en los que n es 1-40 y

A representa

- 10 $-C(=O)$ -, $-O-C(=O)$ -, $-NH-C(=O)$ -, $-C(C=O)NH-S(=O)_2$ -, $-S(=O)_2NH-C(=O)$ -, $-(CH_2)_{1-5}$ -, $-O-(CH_2)_{1-5}$ -, o $-O-(CH_2)_{1-5}-C(=O)$ - y

Q representa un enlace o

$-[NH-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)]_q$ -, o

$-O-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)$ -, o

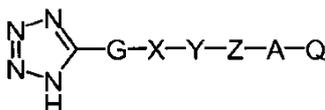
- 15 $-S-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)$ -, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

R representa un enlace o un poli-radical, tal como $[NH(CH_2)_4CH(NH-)C(O)]_{1-5}$ y

t es 1-40 y

el término 'molécula' se refiere a un compuesto que comprende un grupo amino o un grupo mercapto, al cual puede unirse covalentemente un grupo A o Q.

- 20 5. Un compuesto de acuerdo con la realización 4, en el que G, X e Y son todos un enlace.
6. Un compuesto de acuerdo con la realización 4, en el que G, X e Y se seleccionan todos de $-(CH_2)_{1-10}$ -.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-6, en el que t es 1.
8. Un compuesto de acuerdo con realización 7, en el que

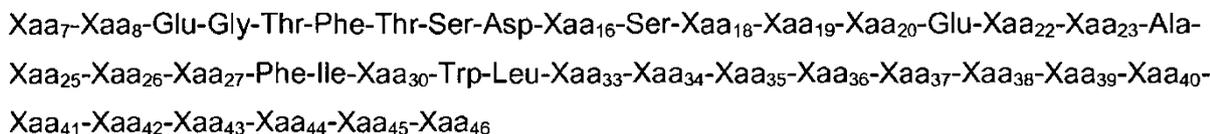


- 25 es 16-(5-tetrazolil)hexadecanoílo, 4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butirilo, 2-(2-(2-(16-(tetrazol-5-il)(hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetilo) o [2-(2-{2-(2-carbamoil-metoxietoxi)etilcarbamoil}metoxi)etoxi]etil]amida del ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico.
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-8, en el que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo ε-amino de un residuo de lisina.
- 30 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-8, en el que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo tiol de un residuo de cisteína.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-10, en el que la molécula es un agente terapéutico.
12. Un compuesto de acuerdo con la realización 11, en el que el agente terapéutico es un biopolímero.
- 35 13. Un compuesto de acuerdo con la realización 11, en el que el agente terapéutico es un polipéptido.
14. Un compuesto de acuerdo con la realización 11, en el que el agente terapéutico es un fármaco de molécula pequeña.
15. Un compuesto de acuerdo con la realización 13, en el que el polipéptido es un péptido insulínico.
16. Un compuesto de acuerdo con la realización 15, en el que el polipéptido es GLP-1 (7-37) o una variante del

mismo.

17. Un compuesto de acuerdo con la realización 15, en el que el polipéptido es GLP-1 (7-37) o un análogo del mismo.

5 18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16-17, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula (IV):



Fórmula (III) (SEQ ID N.º: 3)

en la que

10 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, ácido 2-amino-3-(2-aminoimidazol-4-il)propiónico, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico, ácido 1-aminociclobutanocarboxílico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico, ácido 1-aminocicloheptanocarboxílico, o ácido 1-aminociclooctanocarboxílico;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

15 Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

20 Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;

Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃₃ es Val o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn o Arg;

25 Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg, Gly o Lys;

Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente;

Xaa₃₈ es Lys, Ser, amida o está ausente;

Xaa₃₉ es Ser, Lys, amida o está ausente;

30 Xaa₄₀ es Gly, amida o está ausente;

Xaa₄₁ es Ala, amida o está ausente;

Xaa₄₂ es Pro, amida o está ausente;

Xaa₄₃ es Pro, amida o está ausente;

Xaa₄₄ es Pro, amida o está ausente;

35 Xaa₄₅ es Ser, amida o está ausente; Xaa₄₆ es amida o está ausente;

con la condición de que si Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ o Xaa₄₆ está ausente, entonces

cada residuo de aminoácido cadena abajo también estará ausente.

19. Un compuesto de acuerdo con la realización 18, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula (V):

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-
Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈**

Fórmula (IV) (SEQ ID N.º: 4)

5 en la que

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^o-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

10 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico, ácido 1-aminociclobutanocarboxílico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico, ácido 1-aminocicloheptanocarboxílico, o ácido 1-aminociclooctanocarboxílico; Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

15 Xaa₃₄ es Lys, Glu o Arg;

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg o Lys;

Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu o Lys;

Xaa₃₈ es Lys, amida o está ausente.

20 20. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-19, en el que dicho polipéptido se selecciona entre GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-36)-amida, GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-38), GLP-1 (7-39), GLP-1 (7-40), GLP-1(7-41) o un análogo de los mismos.

25 21. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-20, en el que dicho polipéptido comprende no más de quince residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o delecionado en comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID N.º: 1), o no más de diez residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o delecionado en comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID N.º: 1).

22. Un compuesto de acuerdo con la realización 21, en el que dicho polipéptido comprende no más de seis residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o delecionado en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID N.º: 1).

30 23. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-22, en el que dicho polipéptido comprende no más de 4 residuos de aminoácido que no están codificados por el código genético.

24. Un compuesto de acuerdo con la realización 17, en el que dicho polipéptido es un péptido insulínico protegido de DPP-IV.

25. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-24, en el que dicho polipéptido comprende un residuo de Aib en la posición 8.

35 26. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-25, en el que el residuo de aminoácido en la posición 7 de dicho polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en D-histidina, desamino-histidina, ácido 2-amino-3-(2-aminoimidazol-4-il)propiónico, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^o-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4-piridilalanina.

40 27. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-26, en el que dicho polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en Arg³⁴GLP-1(7-37),

Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1 (7-36),

Aib^{8,22,35} GLP-1 (7-37), Aib^{8,35} GLP-1 (7-37), Aib^{8,22} GLP-1 (7-37),

Aib^{8,22,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38),

Aib^{8,22} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38),

Aib^{8,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22,35} Arg²⁶Lys³⁸GLP-1 (7-38),

Aib^{8,35} Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22} Arg²⁶Lys³⁸GLP-1 (7-38),

5 Aib^{8,22,35} Arg³⁴Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38),

Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38),

Aib^{8,22,35} Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1(7-37) y Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1 (7-38).

28. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 17-27, en el que dicho polipéptido se une a R mediante el residuo de aminoácido en la posición 23, 26, 34, 36 o 38 respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N.º: 1.

29. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13 y 15, en el que dicho polipéptido es exendina-4 o un análogo del mismo.

30. Un compuesto de acuerdo con la realización 29, en el que dicho polipéptido es un análogo de exendina-4 que comprende no más de doce residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o delecionado en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2), o no más de ocho residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o delecionado en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2).

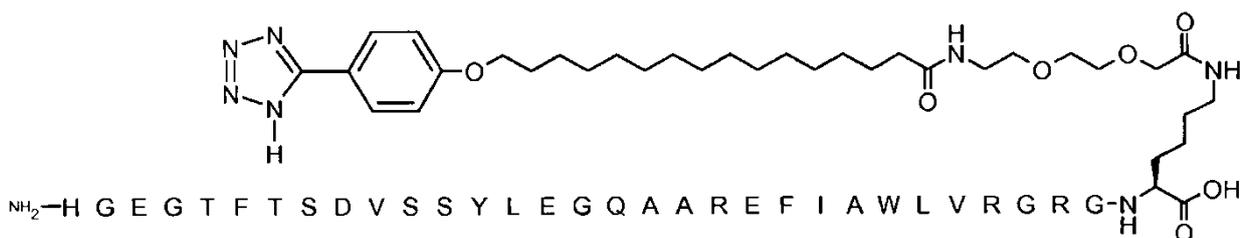
31. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13, 15 o 30, en el que dicho polipéptido es ZP-10, es decir, HGEFTTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-amida (SEQ ID N.º: 5).

32. Un compuesto de acuerdo con la realización 4, en el que dicho compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en N-ε-26-(16-[5-tetrazolil]hexadecanoil)Arg³⁴GLP-1-(7-37),

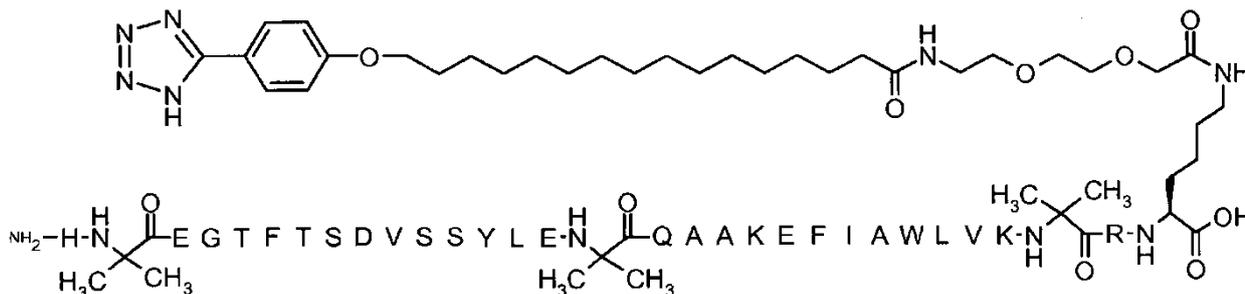
Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1 (7-37)Lys(16-(5-tetrazolil)hexadecanoil), Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1 (7-37)Lys(4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butiril), N-ε-26-{4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butiril} Arg³⁴GLP-1 (7-37),

N-ε-37-(2-(2-(2-(16-(tetrazol-5-il)(hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetil)) Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1 (7-37),

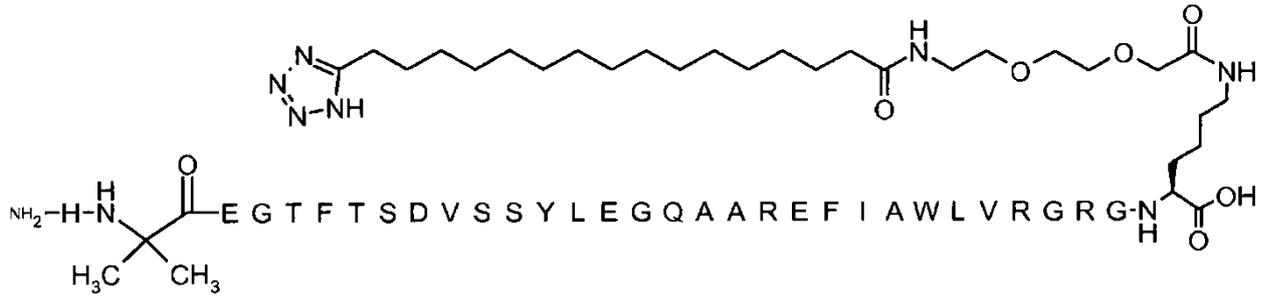
25 [2-(2-{[2-(2-carbamoilmetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etil]amida)-NH₂ del ácido Gly⁸,Glu^{22,23,30}Arg^{18,26,34} GLP-1 (7-37)Lys(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico y péptido Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1 (7-37)Lys(4-(4-(4-(4-(5-tetrazolil)fenil)fenil)fenoxi)butiril), N-ε³⁸-(2-(2-(2-(16-(4-(5-tetrazolil)fenoxi)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil) [Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁸]GLP-1(7-37)



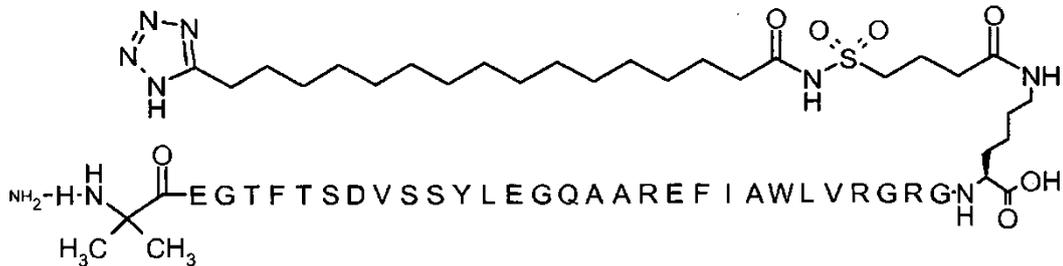
30 N-epsilon37-(2-(2-(2-(16-(4-(5-Tetrazolil)fenoxi)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1 (7-37)



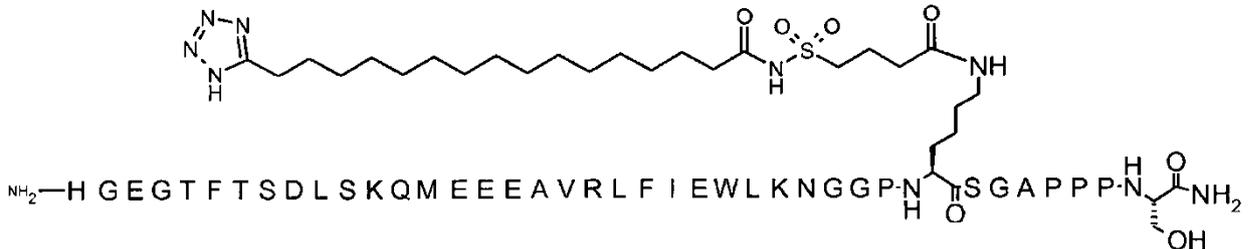
péptido N^ε38-(2-(2-(2-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil) [Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1 (7-37)



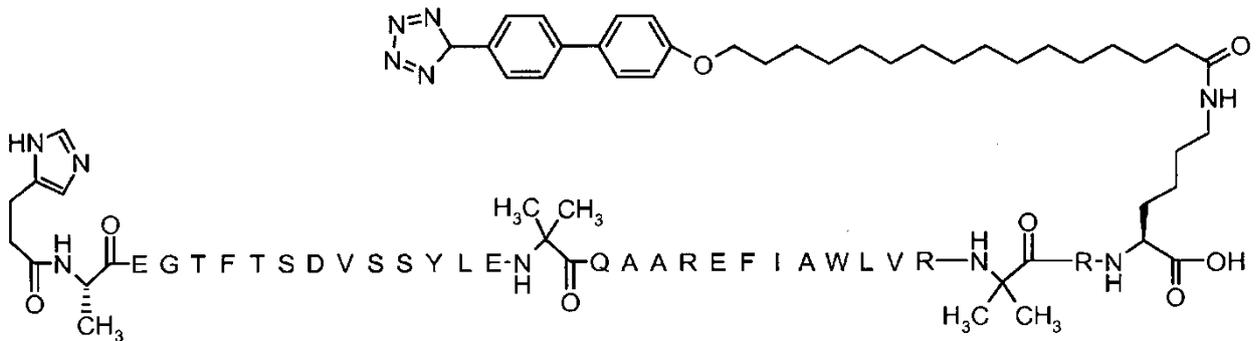
péptido N^ε38-(4-(N-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)butiril) [Aib8,Arg26,34, Lys38]GLP-1 (7-37)



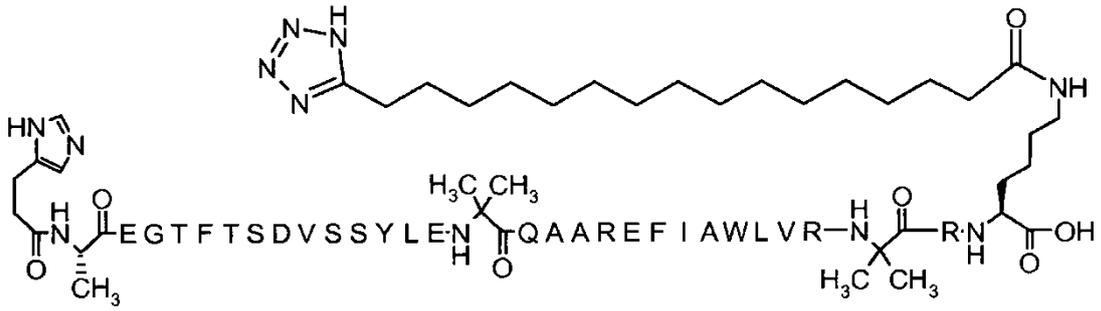
5 péptido N-epsilon32-(4-[N-(16-{5-Tetrazolil})hexadecanoil)sulfamoil]butiril)-[Lys32]Exendina[1-39]



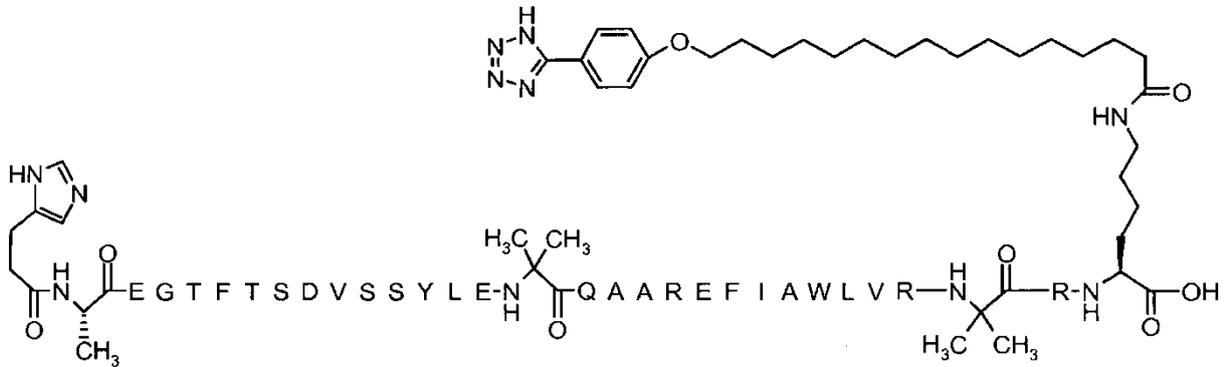
péptido N-epsilon37-(16-(4'-(Tetrazol-5-il)bifenil)-4-iloxi)hexadecanoil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



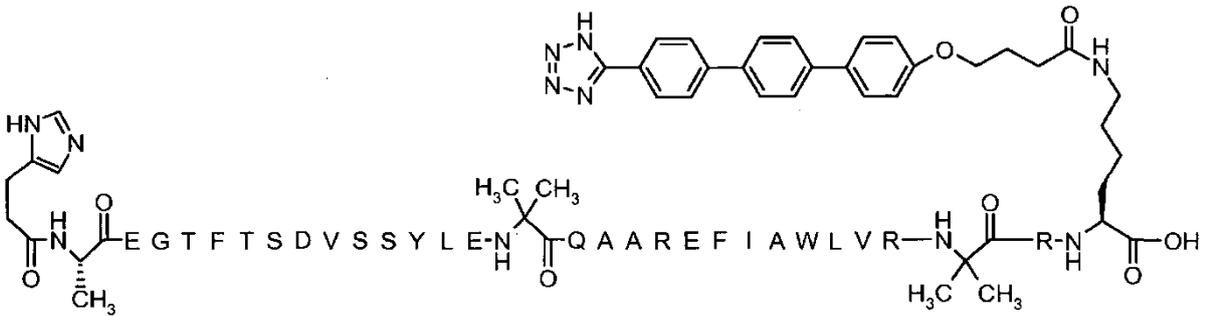
10 N-epsilon37-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



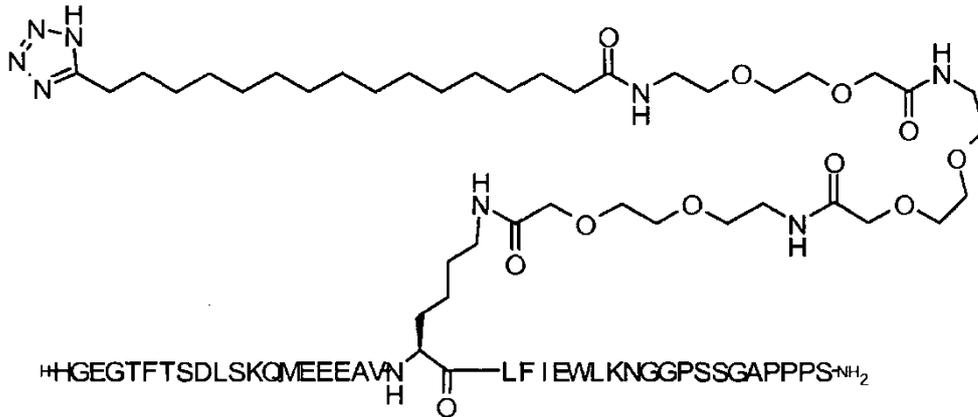
N-epsilon37-(16-(4-(Tetrazol-5-yl)phenoxy)hexadecanoyl) [3-(4-imidazolyl)propionyl]7,Aib22,35,Arg26,34, Lys37]GLP-1 (7-37)



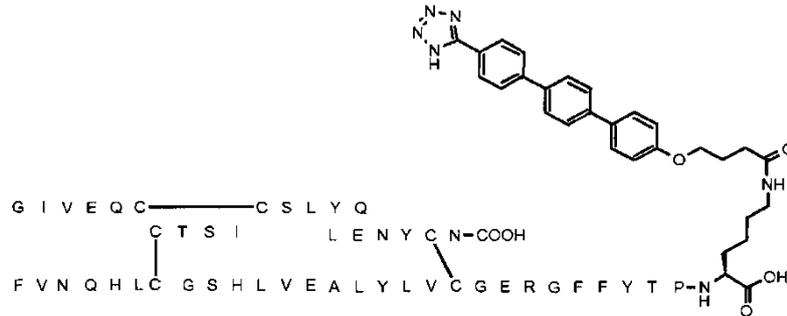
5 N-epsilon37-(4-(4-(Tetrazol-5-yl)[1,1',4',1'']terphenyl-4''-yloxy)butyryl) [3-(4-imidazolyl)propionyl]7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



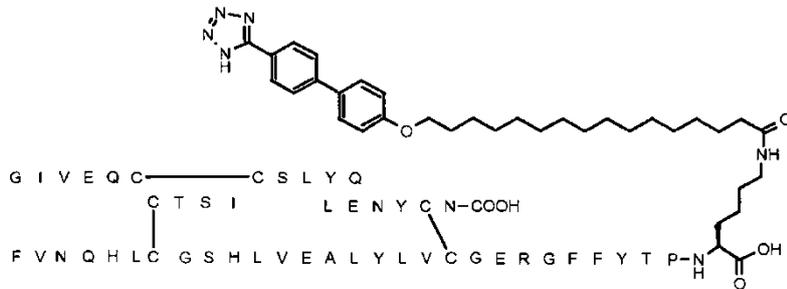
N-epsilon37-(2-(2-(2-(16-(Tetrazol-5-yl)hexadecanoyl)amino)ethoxy)ethoxy)acetyl] [Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37] GLP-1 (7-37)



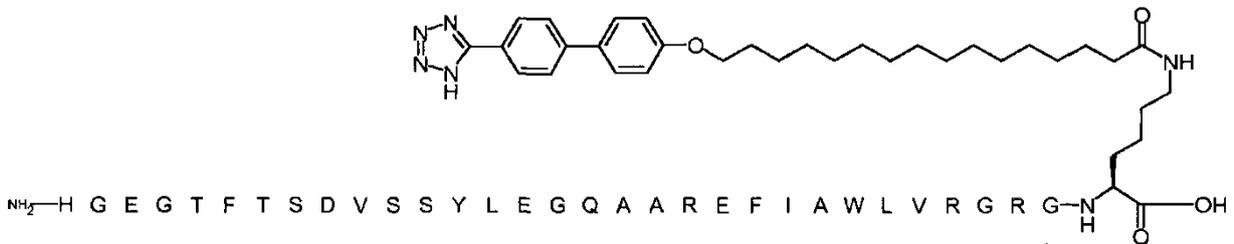
N^εB²⁹-(16-2H-Tetrazol-5-il-hexadecanoil) gamma-Glu-des(B30) insulina humana, N^{B29ε}-4-[4''-(1H-Tetrazol-5-il)-[1,1';4',1'']terfenil-4-iloxi]-butiroil des(B30) insulina



5 N^{B29ε}-16-[4'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-iloxi]-hexadecanoil des(B30) insulina



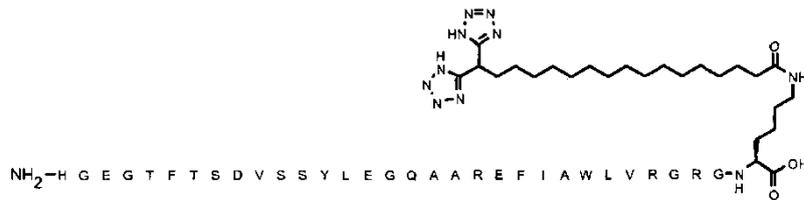
péptido N^{ε37}-16-(4-(4-(5-Tetrazolil)fenil)feniloxi)hexadecanoil-[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



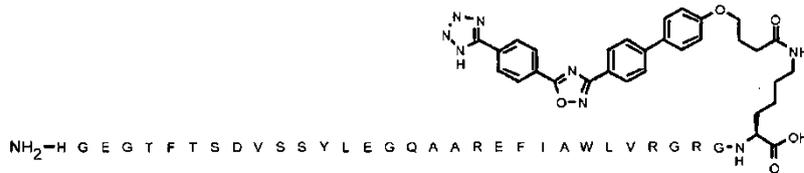
péptido N^{ε37}-(4-(4-(4-(4-(5-Tetrazolil)fenil)fenil)fenil)fenil)feniloxi)butiril-[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



péptido N^{ε37}-(17,17-Bis(5-tetrazolil)heptadecanoil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)

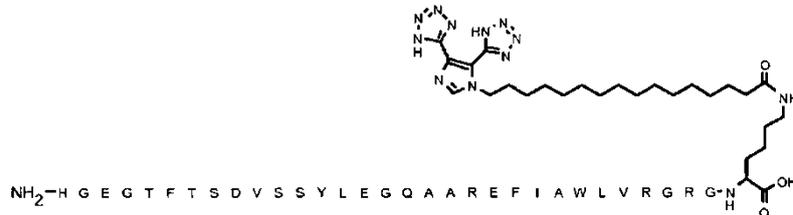


péptido N^{ε37}-(4-(4'-{5-[4-(5-Tetrazolil)fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il}bifenil-4-iloxi)butiril)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)

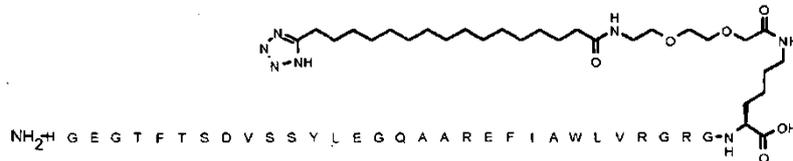


5

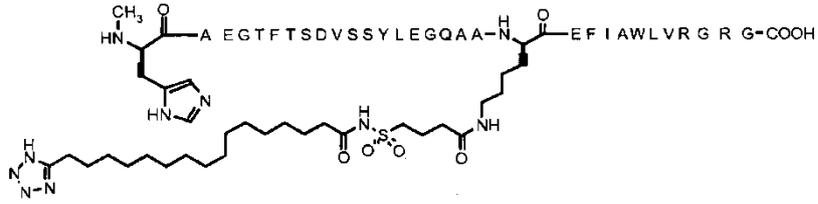
péptido N^{ε37}-(16-(4,5-Bis(5-Tetrazolil)imidazol-1-il)hexadecanoil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



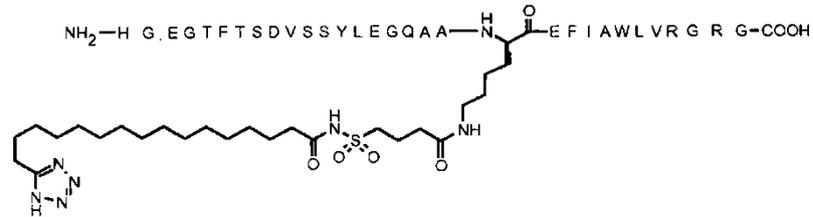
péptido N^{ε37}-(2-(2-(16-(5-Tetrazolil)hexadecanoilamino) etoxi)etoxi)acetil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



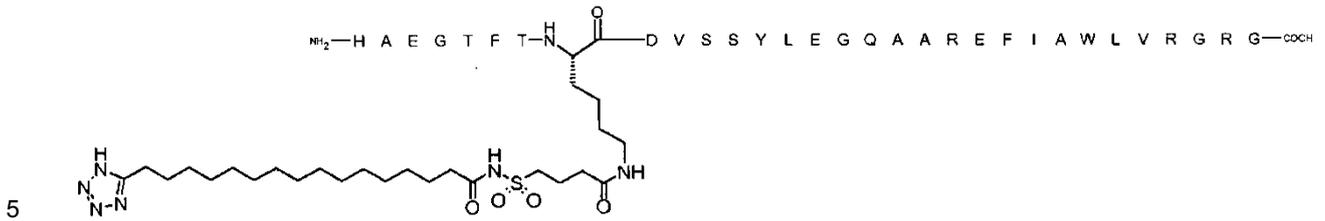
10 péptido N^{ε26}-(4-{16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil}butiril)[(3-(4-imidazolil)propionil7,Arg34]GLP-1-(7-37)



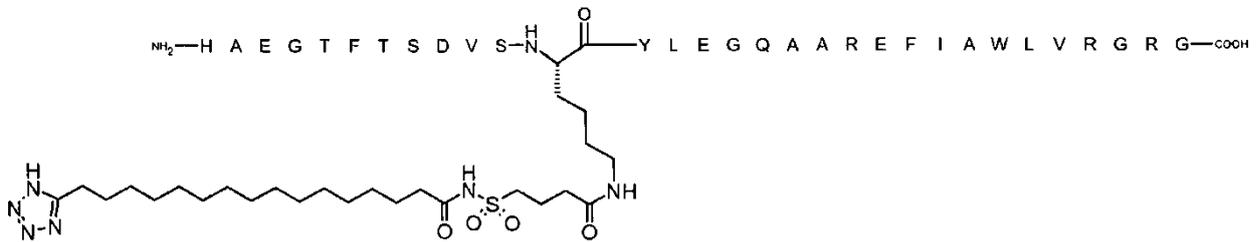
péptido N ϵ ²⁶-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)-[Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)



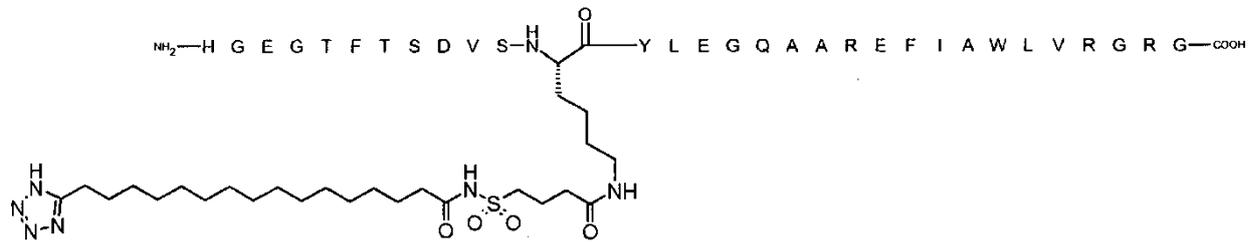
péptido N ϵ ¹⁴-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys14;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



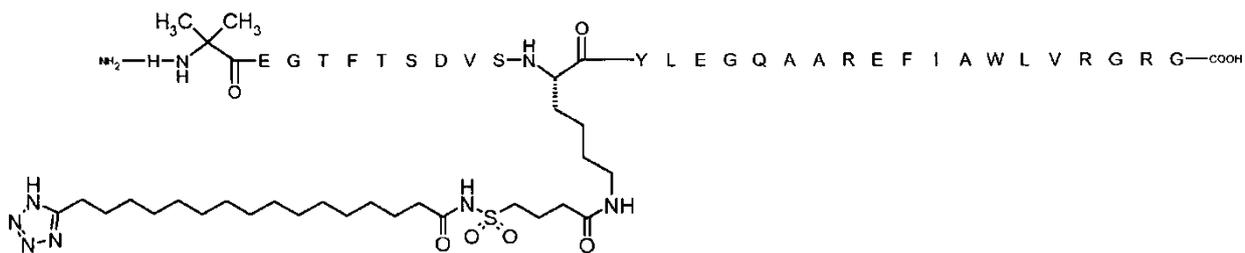
péptido N ϵ ¹⁸-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



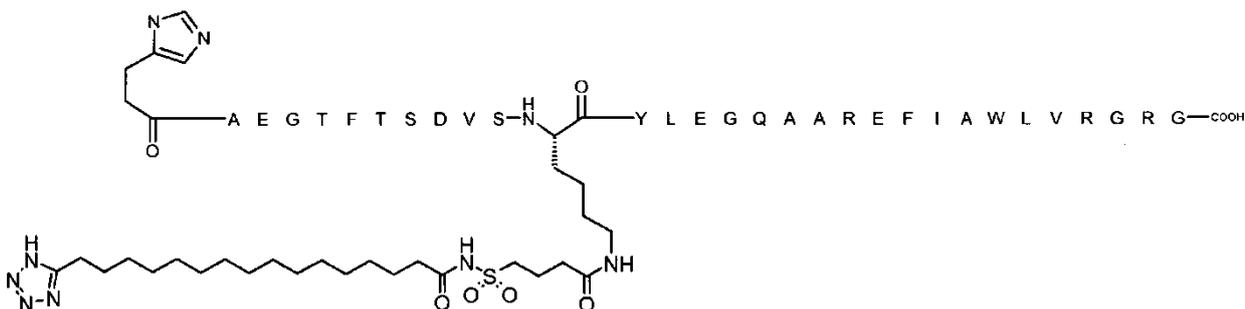
péptido N ϵ ¹⁸-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Gly8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



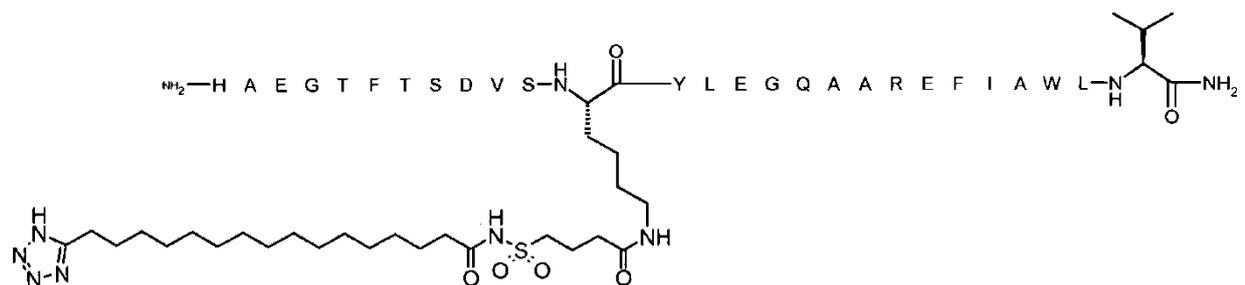
10 péptido N ϵ ¹⁸-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Aib8,Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



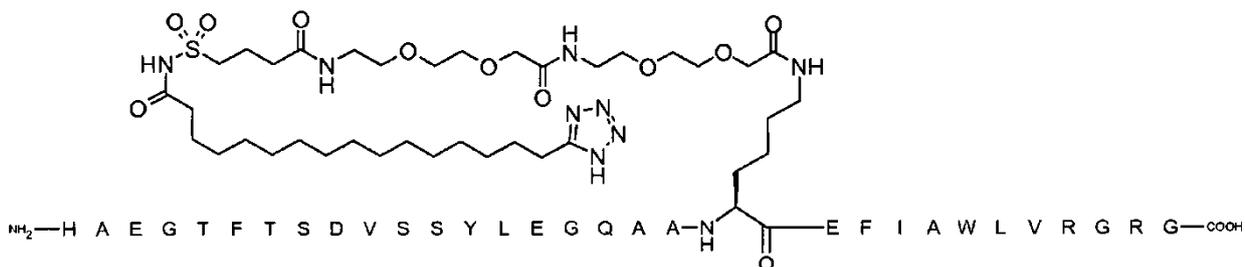
péptido N^{ε18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[3-(4-imidazolil)propionil7;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



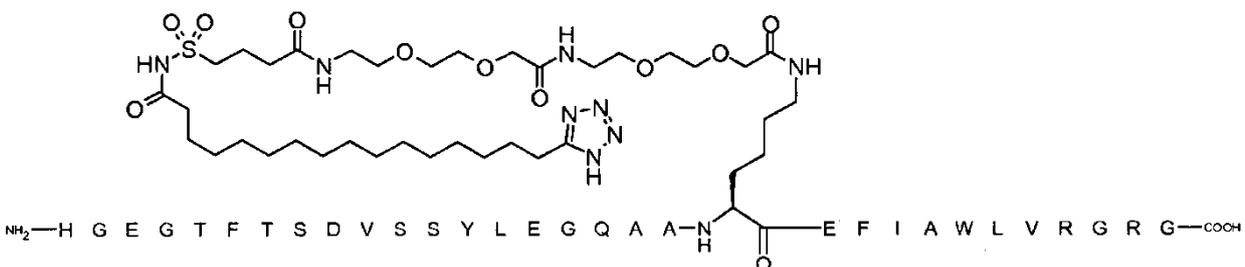
5 peptidoamida N^{ε18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys18;Arg26]GLP-1-(7-33)



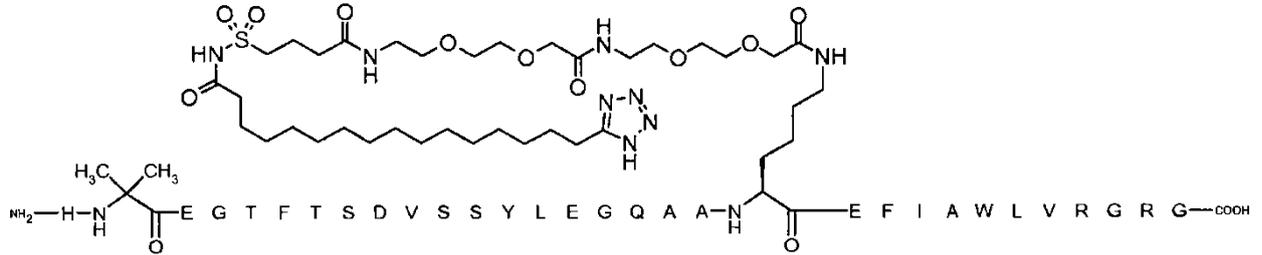
péptido N^{ε26}-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)-etoxi)acetil)-[Arg34]GLP-1-(7-37)



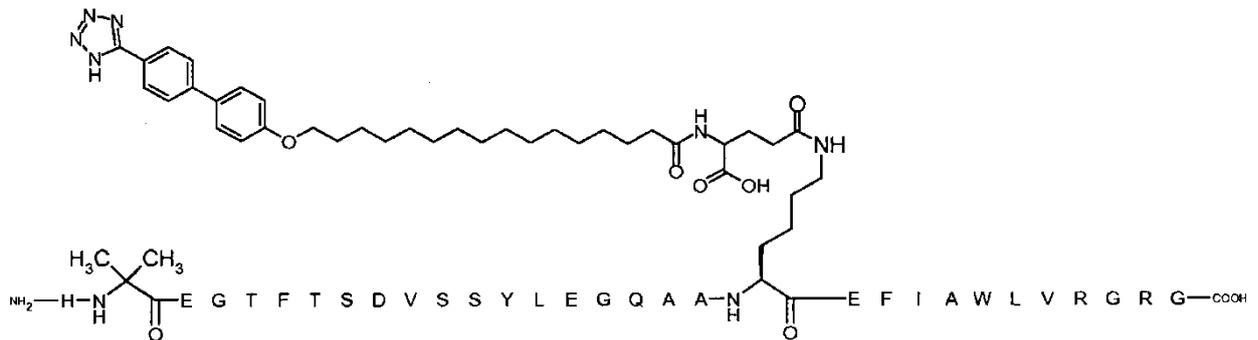
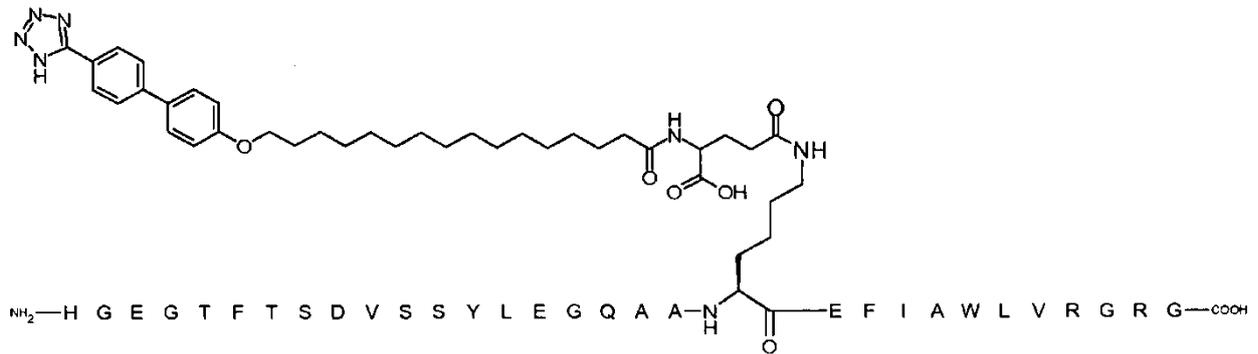
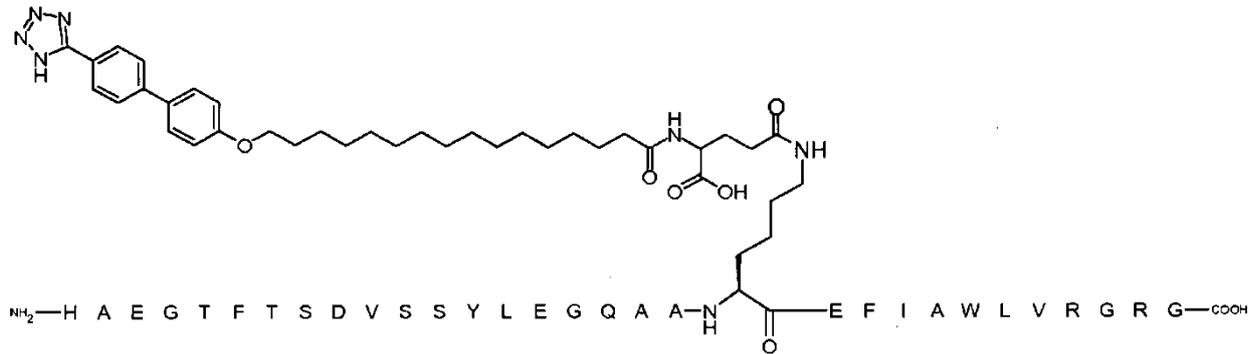
10 péptido N^{ε26}-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)-etoxi)acetil)[Gly8,Arg 34]GLP-1-(7-37)

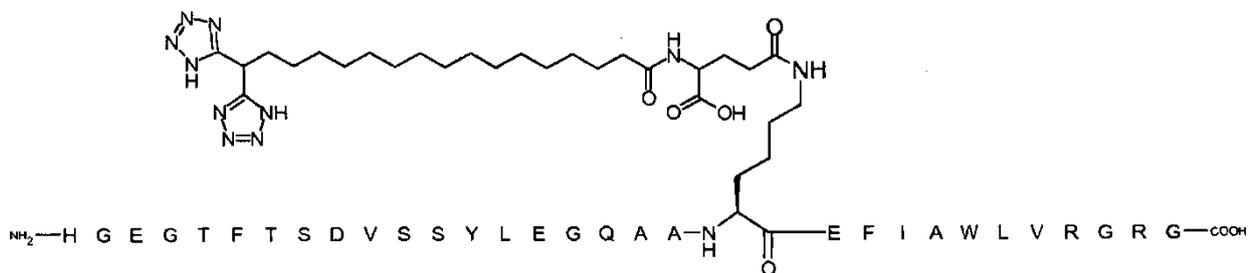
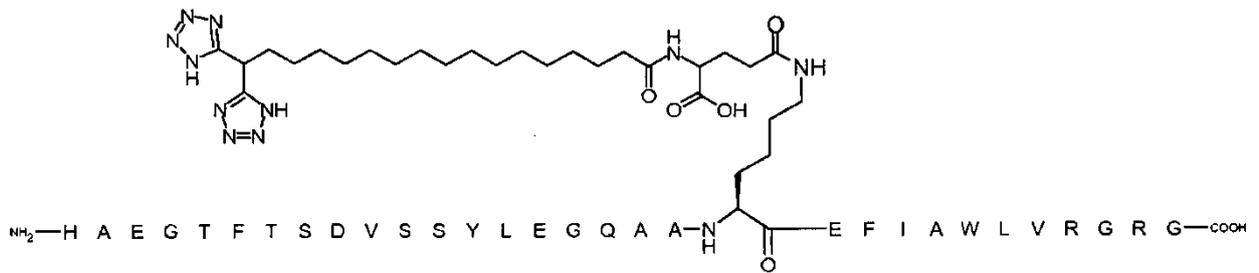
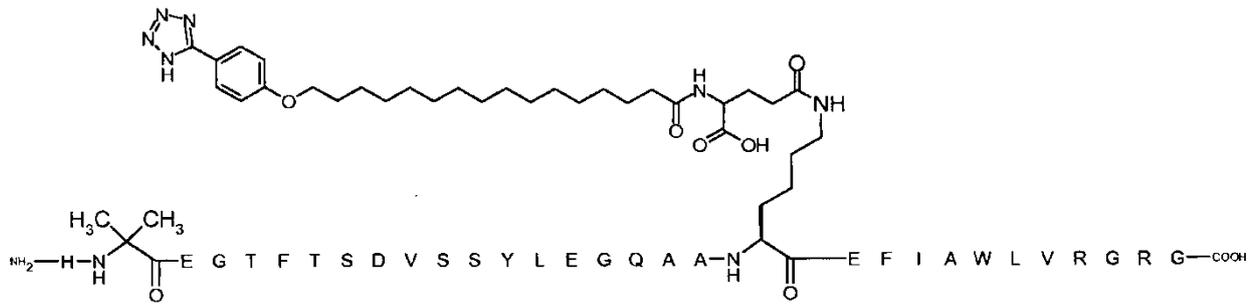
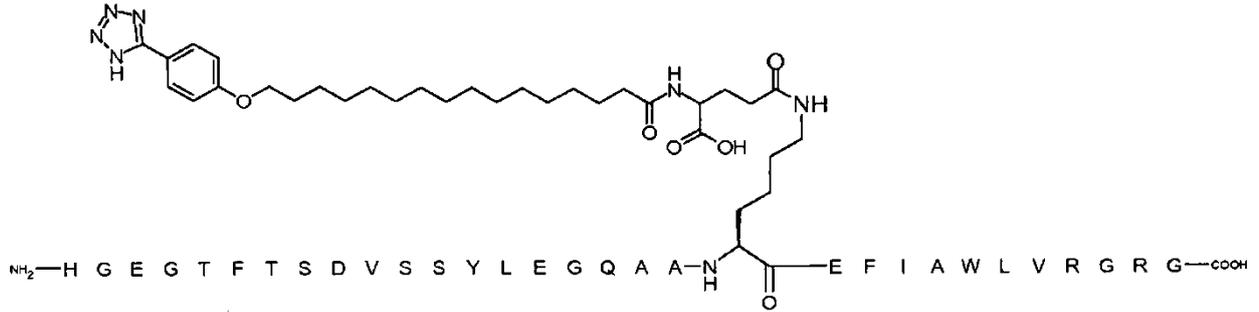
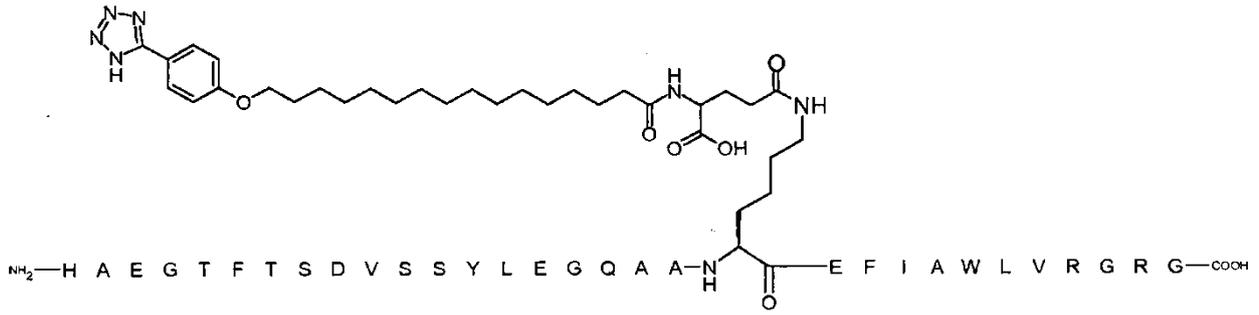


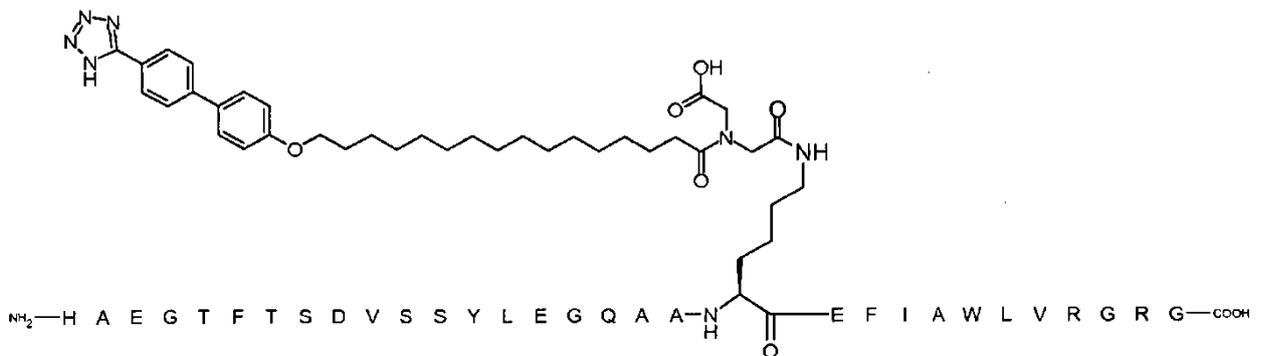
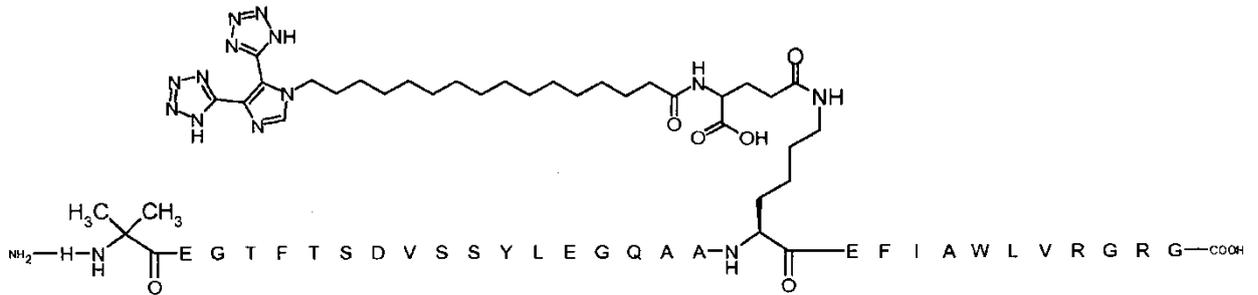
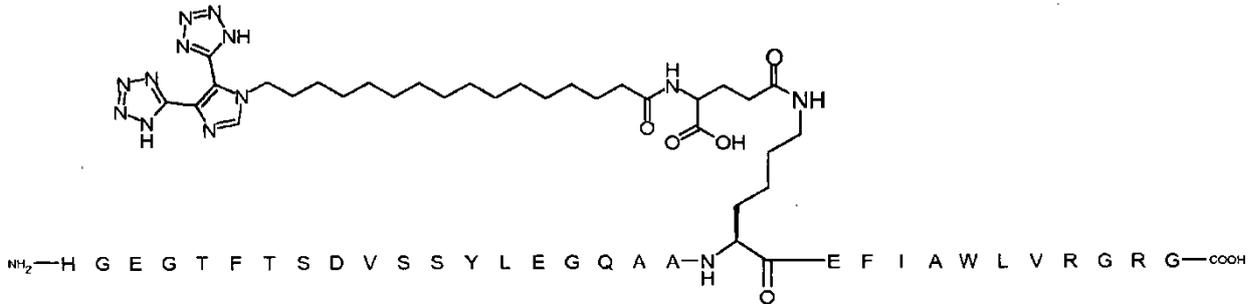
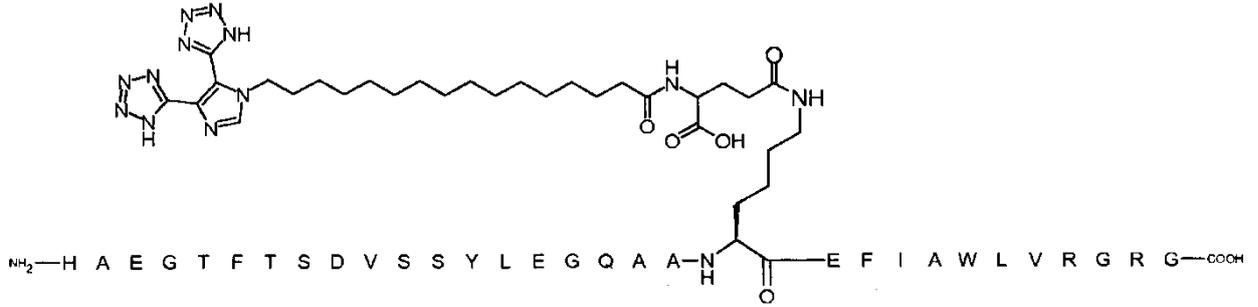
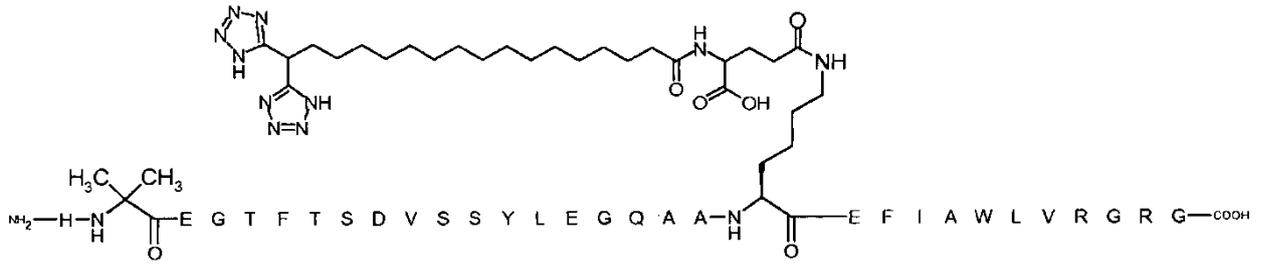
péptido N^{E26}-((2-(2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)-etoxi)acetil)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)

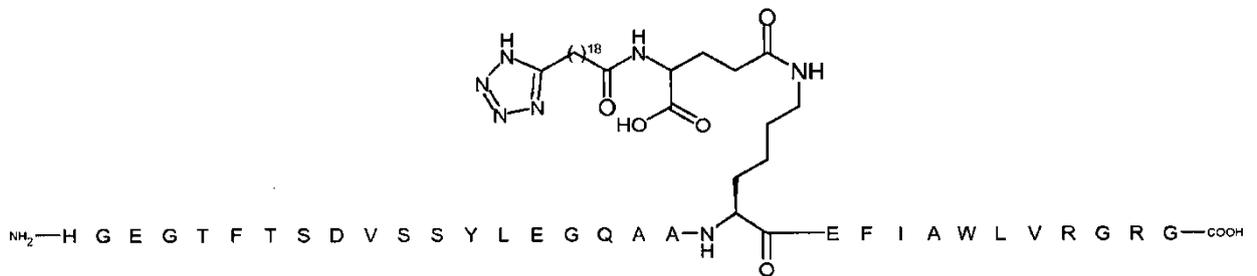
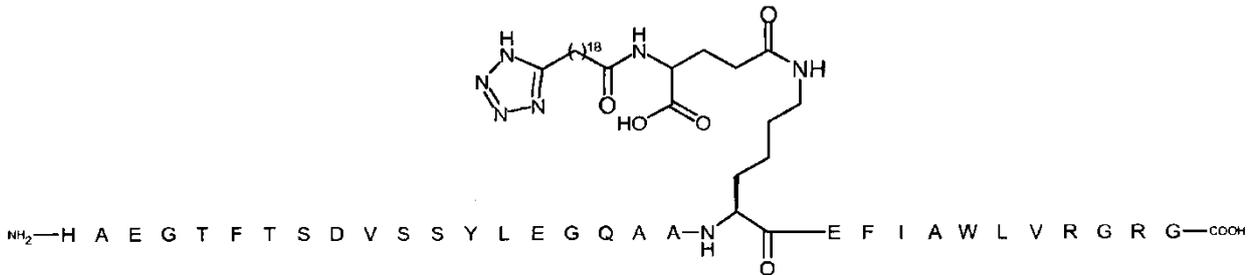
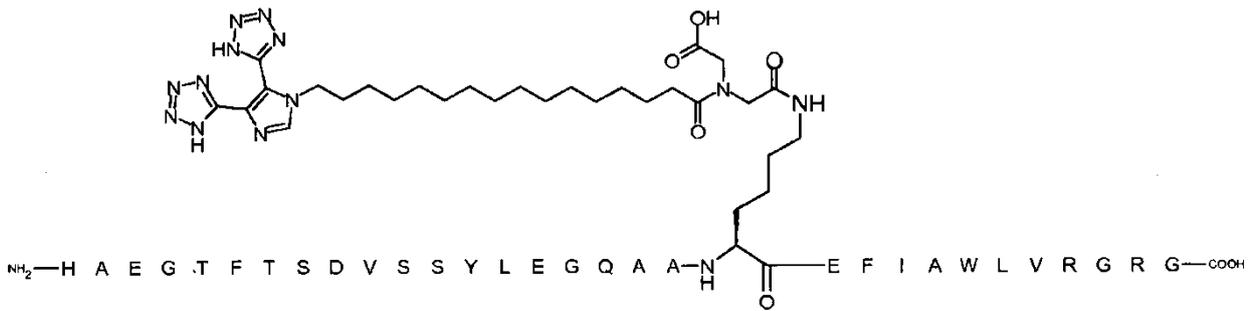
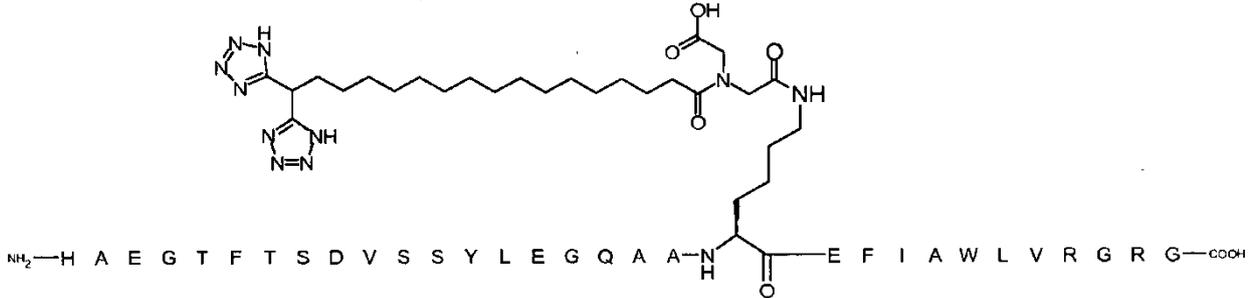
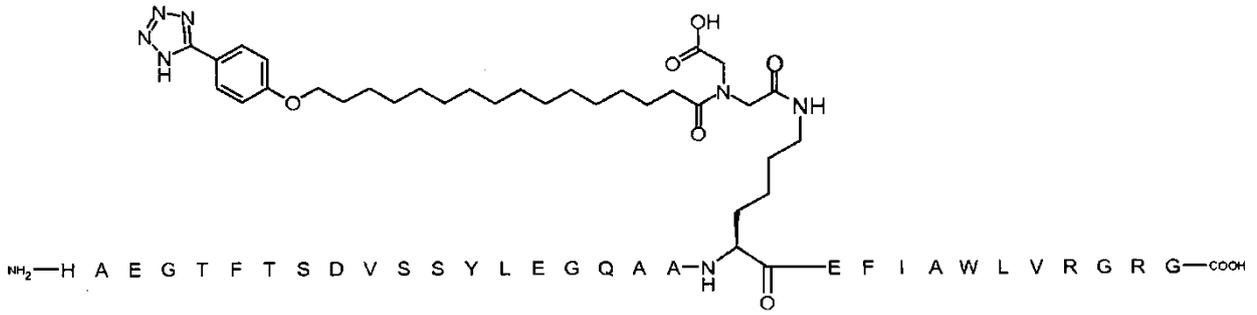


5



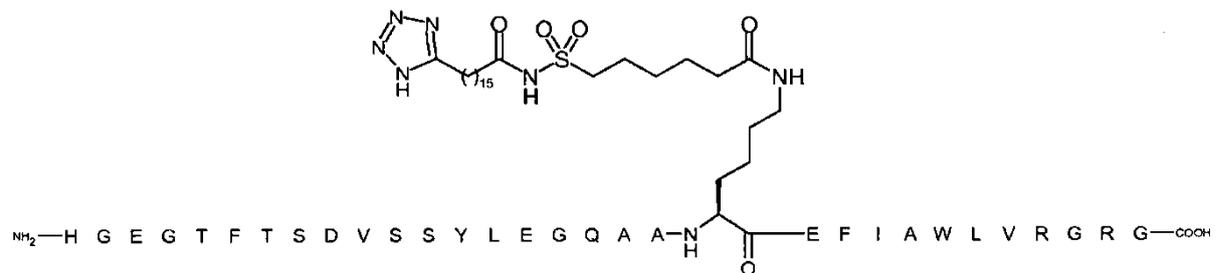
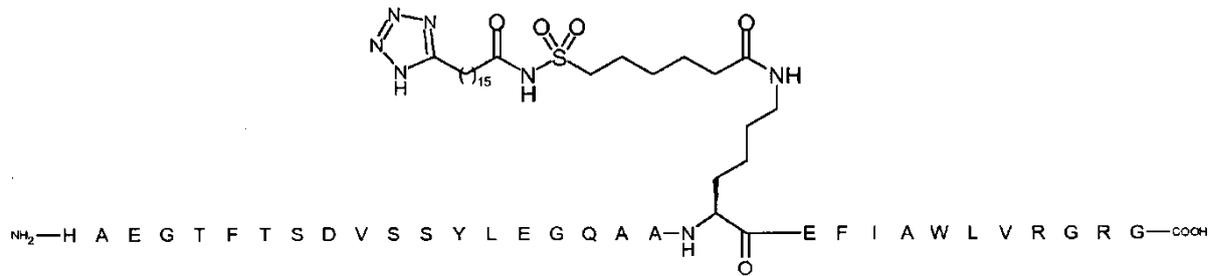
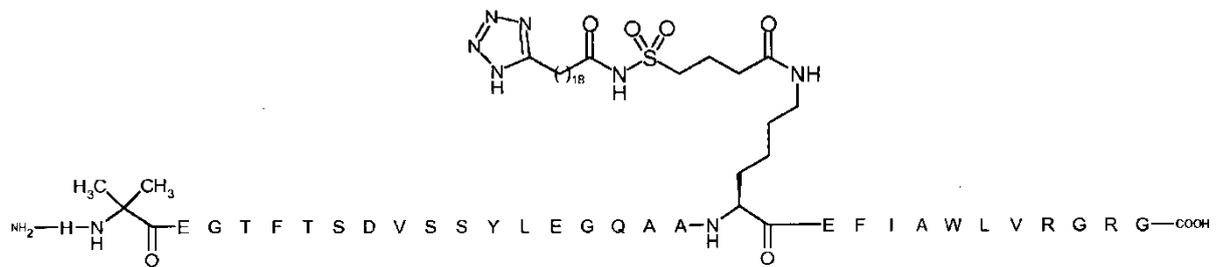
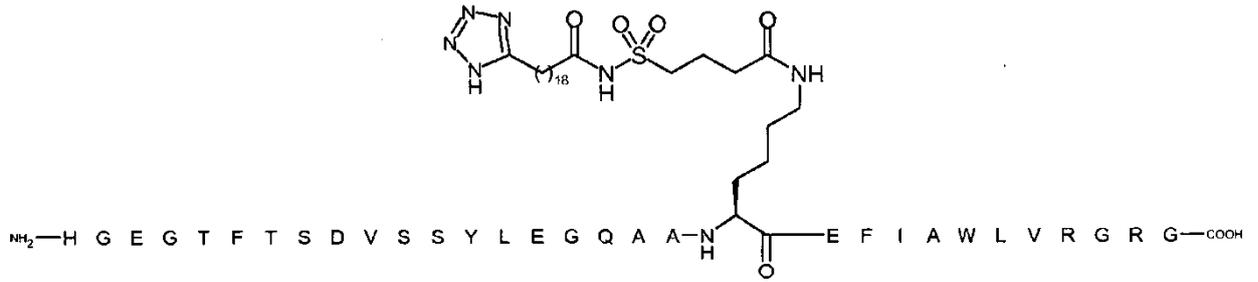
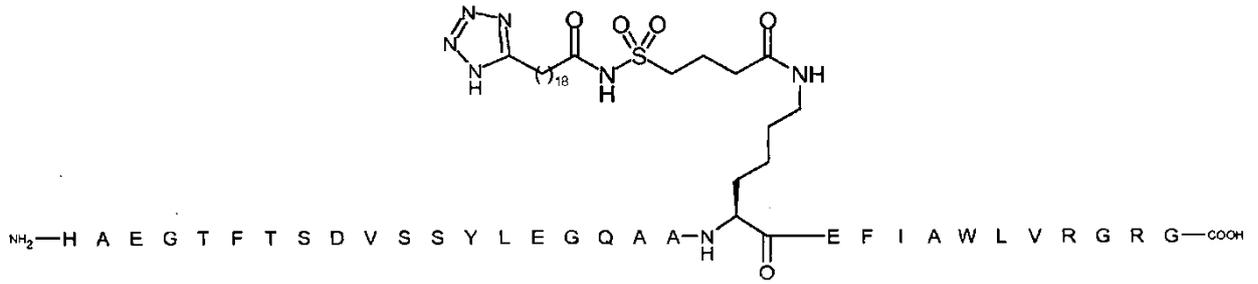


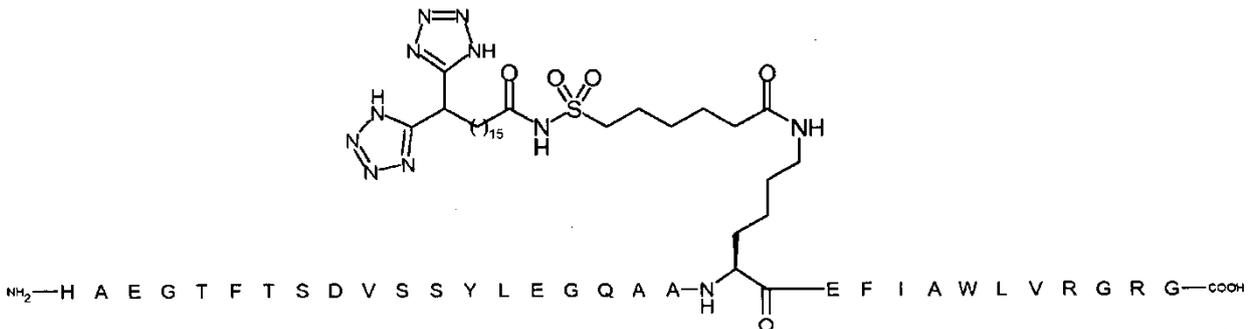
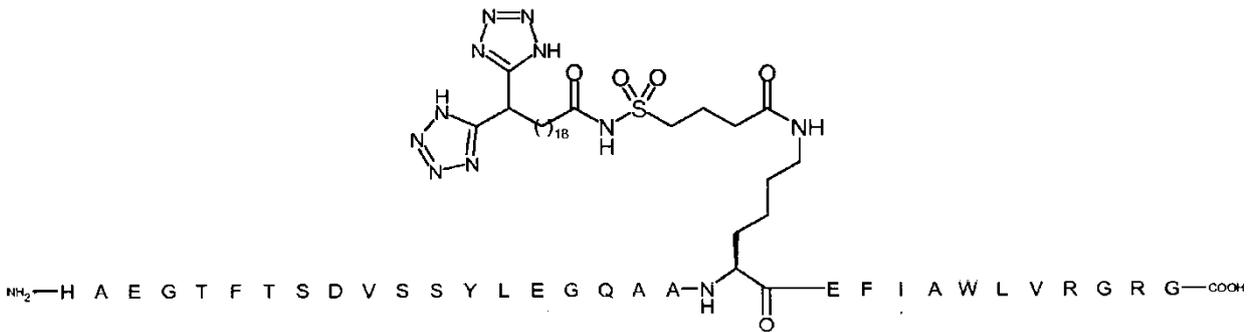
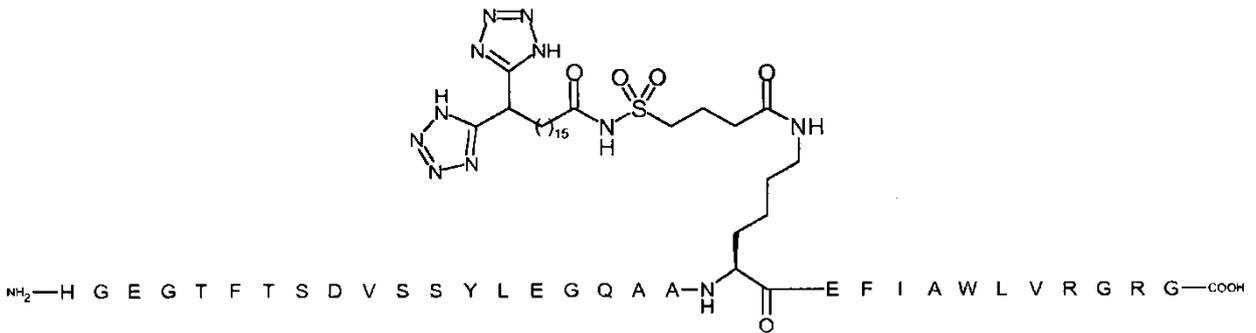
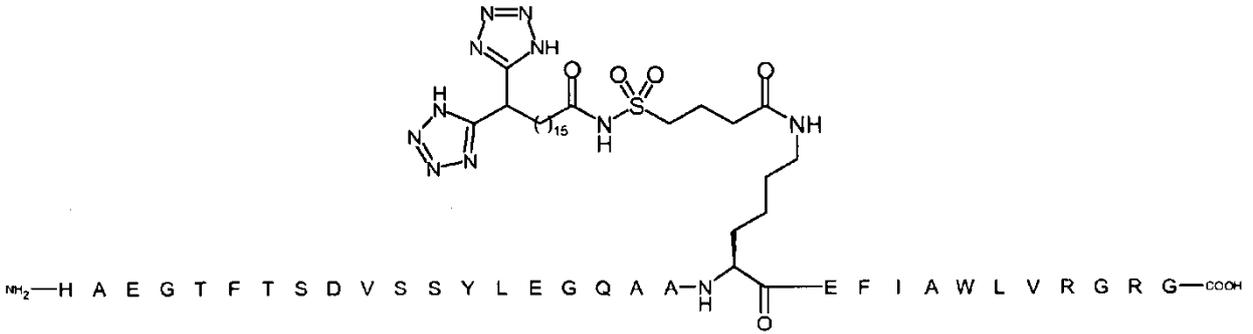
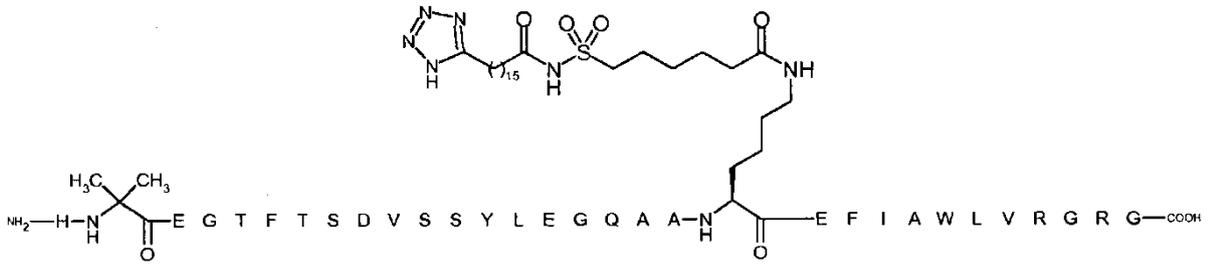


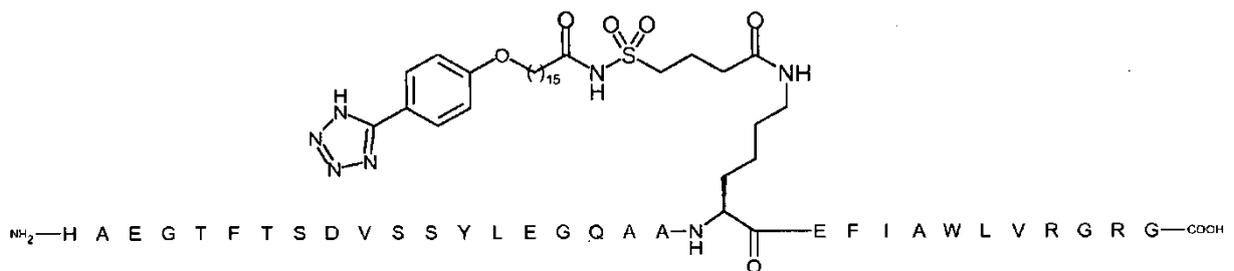
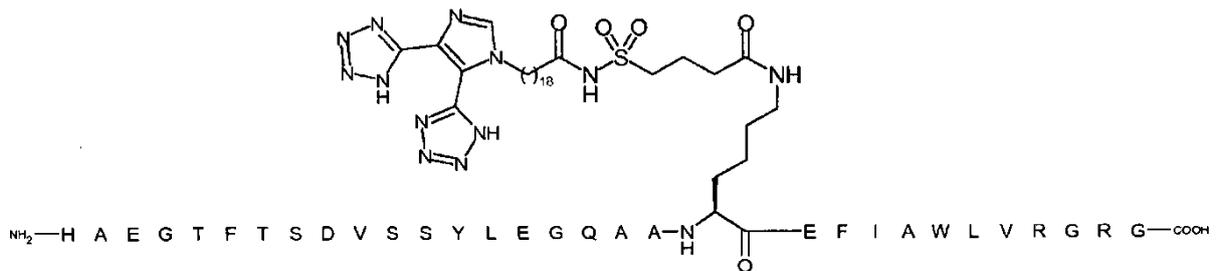
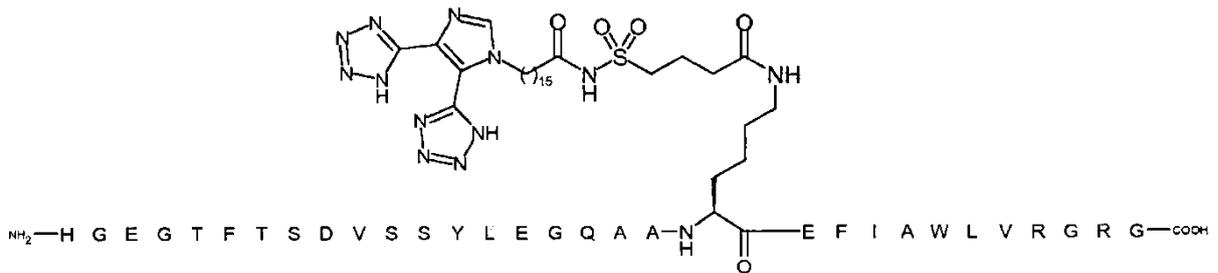
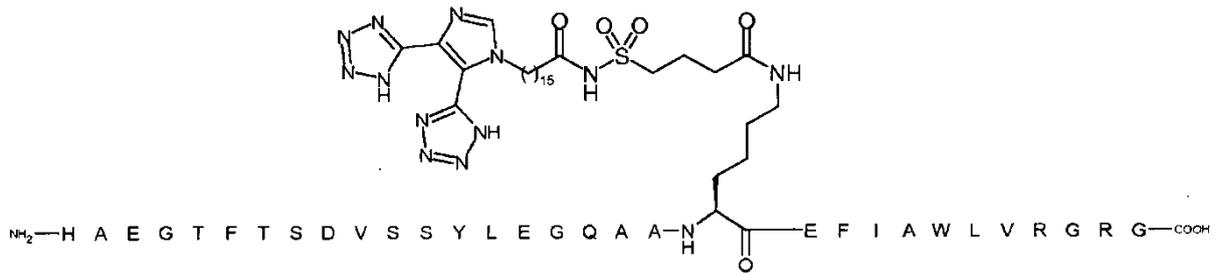
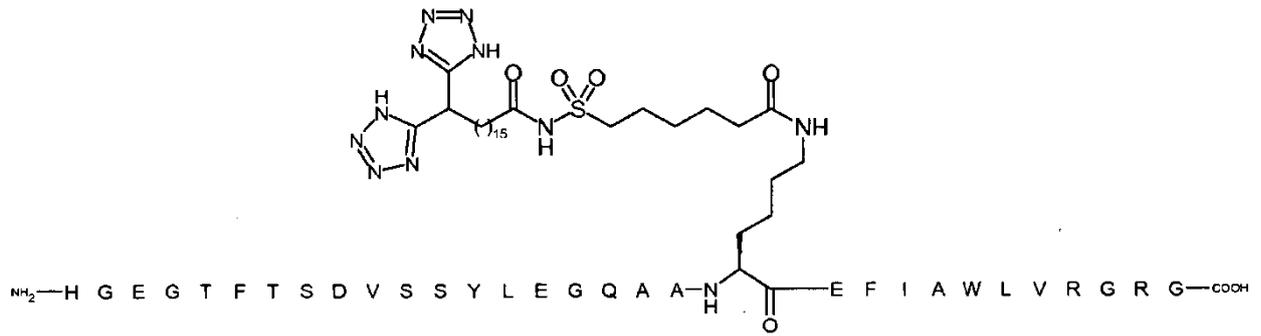


5

péptido N^{ε26}-(4-(19-(Tetrazol-5-il)nonadecanoilsulfamoil)butiril)[Arg34]GLP-1-(7-37)



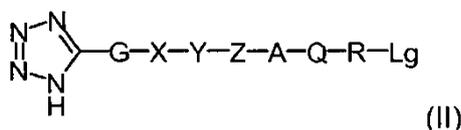




34. Un compuesto de acuerdo con realización 13, en el que el agente terapéutico es insulina humana o un análogo de la misma.

35. Un compuesto de acuerdo con la realización 13, en el que el agente terapéutico es factor VII o un análogo del mismo.

5 36. Un compuesto de fórmula general (II):



en la que G, X, Y, Z, A, Q y R representan grupos definidos en la realización 3 y Lg es un grupo saliente, tal como Cl, Br, I, OH, -OSO₂Me, -OSO₂CF₃, -OTs, -SMe₂⁺, -OSu, -OBt, -OAt, -OPh, u -O(4-NO₂)Ph.

10 37. Uso de un compuesto de acuerdo con la realización 36 para la síntesis de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-35.

38. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 4-35 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

39. La composición farmacéutica de acuerdo con la realización 38, que es adecuada para administración parenteral.

15 40. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 15-32 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos asociados con hipervolemia tóxica, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria, apoplejía y otros trastornos cardiovasculares, síndrome inflamatorio del intestino, dispepsia y úlceras gástricas.

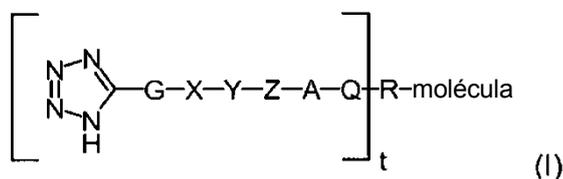
20 41. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 15-32 para la preparación de un medicamento para retardar o impedir la progresión de la enfermedad en diabetes tipo 2.

42. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 15-32 para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β, aumentar la función de células β y la masa de células β, estimular la generación de células β y/o para restaurar la sensibilidad a glucosa en las células β.

25 En un aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula con un bioisómero de ácido carboxílico heterocíclico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende unir covalentemente esta molécula a un 1H-tetrazol. In

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende convertir dicha molécula en un compuesto de fórmula general (I):



en la que

G, X e Y representan independientemente un enlace, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀, o

35 arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

$-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CF}_2)_n-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_n-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_n-$, en los que n es 1-40 y

A representa

$-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{1-5}-$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-5}-$, u

$-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-5}-\text{C}(=\text{O})-$ y

5 Q representa un enlace o

$-\text{[NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})]_q-$, u

$-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})-$, o

$-\text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-(\text{CH}_2)_p-\text{E}-\text{C}(=\text{O})-$, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

R representa un enlace o un poli-radical, tal como $[-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}-)\text{C}(=\text{O})-]_{1-5}$ y

10 t es 1-40 y

el término "molécula" se define como en la presente reivindicación 1.

Los tetrazoles son ligeramente más lipófilos que los ácidos carboxílicos, pero son resistentes a muchas de las vías de degradación metabólica que afectan a los ácidos carboxílicos. Como los tetrazoles no pueden actuar como reactivos acilantes, no se requiere grupo protector cuando se acila una proteína con un ácido ω -(tetrazol-5-il)carboxílico.

15

Se ha encontrado que la derivatización de polipéptidos con entidades moleculares que contienen tetrazol se realiza fácilmente y que, sorprendentemente, los conjugados proteína-tetrazol resultantes muestran propiedades biológicas y farmacológicas muy mejoradas.

Como se ilustra en los ejemplos dados a continuación, entre el tetrazol y la molécula de la cual se requiere una semi-vida in plasma prolongada puede haber un espaciador opcional, es decir un fragmento molecular divalente o polivalente capaz de conectar covalentemente uno o varios tetrazoles a la molécula. Este fragmento molecular divalente o polivalente también puede tener influencia sobre las propiedades biológicas del conjugado compuesto-tetrazol(es) y pueden usarse modificaciones estructurales de este espaciador para ajustar y mejorar las propiedades del conjugado. Este espaciador puede ser una combinación de uno o varios elementos estructurales diferentes seleccionados entre cadenas de alqueno, cadenas de alqueno parcial o completamente fluoradas, arilenos, heteroarilenos, oligo(etilenglicol), enlaces amida, lisina, péptidos cortos, oligoamidas cortas y otros fragmentos similares. Para conectar el espaciador que alberga tetrazol a un compuesto de interés, tal como una proteína o péptido terapéuticamente relevante, pueden concebirse diversas estrategias diferentes. Muchos polipéptidos contienen grupos amino (por ejemplo, el grupo amino N-terminal o grupos amino de cadena lateral de lisina), que pueden acilarse mediante un reactivo acilante adecuado, tal como un ácido carboxílico en presencia de un reactivo de acoplamiento, un O-hidroxisucinimidil éster de ácido carboxílico, ésteres de hidroxibenzotriazol, anhídridos de ácido carboxílico, haluros de ácido carboxílico, azidas de ácido carboxílico, ésteres de nitrofenilo, anhídridos carbónicos carboxílicos mixtos, anhídridos sulfónicos carboxílicos mixtos, imidazolidas y similares. Como alternativa, pueden derivatizarse polipéptidos que albergan grupo amino mediante conversión en un carbamato por tratamiento con un haloformiato de alquilo, un carbonato de O-succinimidilo, un azidoformiato de alquilo, o un reactivo relacionado. Como alternativa, pueden derivatizarse polipéptidos que albergan grupo amino mediante conversión en una urea por tratamiento con un isocianato, un haluro de carbamoilo, un carbamato de nitrofenilo, o un reactivo relacionado. Como alternativa, pueden derivatizarse polipéptidos que albergan grupo amino mediante conversión en una sulfonamida por tratamiento con un haluro de sulfonilo o sulfonil imidazolidas.

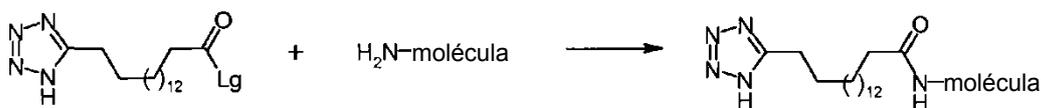
25

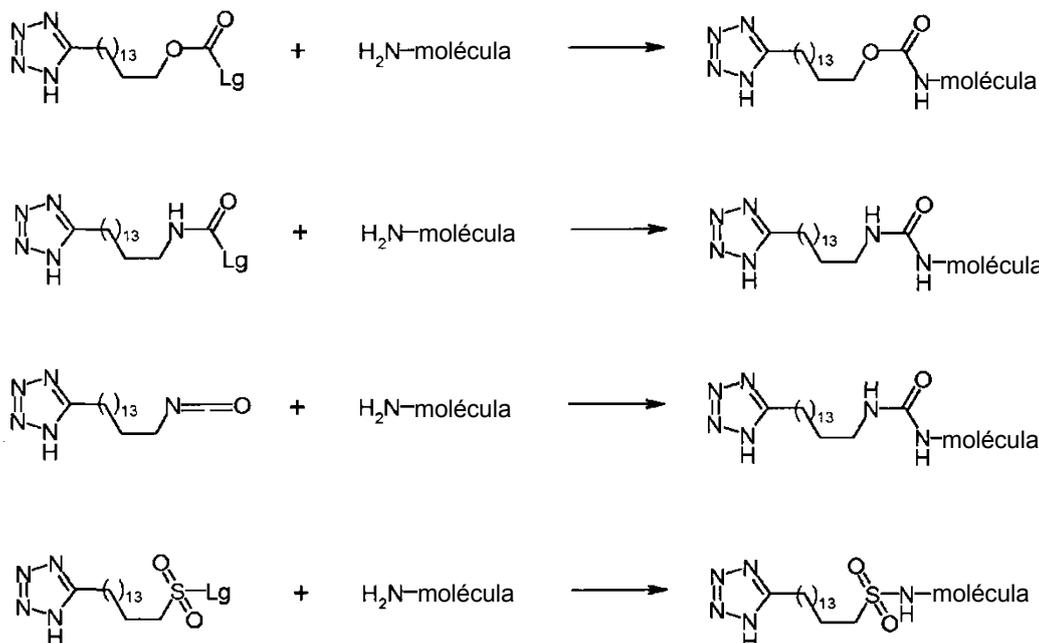
30

35

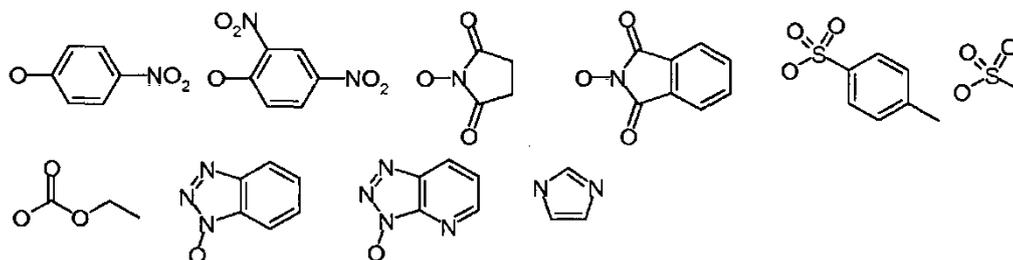
40

Todas estas reacciones de derivatización pueden realizarse sin la necesidad de ningún grupo protector para el anillo de tetrazol y por lo tanto son particularmente muy adecuadas para la derivatización de polipéptidos sensibles. A continuación se esbozan procedimientos ilustrativos no limitantes de derivatización de una molécula que alberga grupo amino con derivados de tetrazol específicos:





5 Lg = Cl, F, Br, I, N₃, CN, OPh,



10 Muchos polipéptidos contienen grupos tiol, que pueden alquilarse por tratamiento con un reactivo alquilante adecuado, tal como un haluro de alquilo, un sulfonato de alquilo, una N-alquilmaleimida, una acrilamida, o un reactivo alquilante relacionado, para unir covalentemente el fragmento que alberga tetrazol al polipéptido. Como alternativa, los grupos tiol también pueden arilarse por tratamiento con un reactivo arilante adecuado, tal como un haluro de arilo, una sal de arilyodonio, una sal de arildiazonio o un reactivo similar.

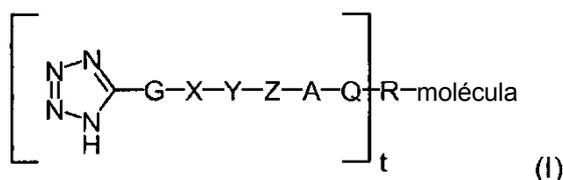
15 Los polipéptidos con serina N-terminal o un grupo funcional relacionado (un 1,2-diol, un 2-aminoetanol) pueden oxidarse por tratamiento con peryodato en un aldehído. Este aldehído reacciona con O-alquilhidroxilaminas para proporcionar oximas y por lo tanto puede usarse para unir un tetrazol que contiene O-alquilhidroxilamina al polipéptido. El aldehído formado por oxidación de serina N-terminal también reacciona con 2-aminoetiltoles (HS-C-C-NH) para proporcionar tiazolidinas, o con hidrazinas para proporcionar hidrazonas y estas reacciones también pueden usarse para la unión de un fragmento que alberga tetrazol a un polipéptido. Los aldehídos también reaccionan con compuestos C,H-ácidos tales como 1,3-dicetonas, 3-oxobutiramidas, malonodinitrilos, derivados de ácido barbitúrico, derivados de ácido malónico y similares para proporcionar alcoholes (adición de aldol) o alquenos (condensación de Knoevenagel). Estas reacciones también pueden usarse para unir tetrazoles a polipéptidos.

20 Las enzimas posibilitan la derivatización selectiva de polipéptidos. Por tanto, pueden usarse carboxipeptidasas para formar amidas a partir de aminas y el grupo ácido carboxílico C-terminal de un polipéptido. Pueden usarse transglutaminasas para formar nuevas amidas a partir de aminas y la cadena lateral de glutamina. Si estas reacciones enzimáticas se realizan con una amina que alberga tetrazol, se producirán compuestos reivindicados en la presente invención. Como alternativa, estas reacciones enzimáticas también pueden realizarse con una amina que contiene un grupo funcional que posibilita una unión covalente selectiva de un fragmento que alberga tetrazol en una segunda operación. Dichos grupos funcionales pueden ser aldehídos, cetonas, hidroxilaminas, alcóxilaminas, hidrazinas, tioles, azidas, 2-aminoetiltoles, 3-aminopropiltioles, 2-hidroxiethyltoles, 3-hidroxiethyltoles, alquenos, nitrilos, compuestos C,H-ácidos, u otros grupos funcionales que posibilitan la unión covalente selectiva de un fragmento que alberga tetrazol. El tratamiento de una amina que contiene uno o varios de estos grupos funcionales proporcionará un polipéptido, que puede derivatizarse selectivamente.

Recientemente, se ha descrito una metodología para la producción de proteínas que contienen aminoácidos no naturales por fermentación (por ejemplo L. Alfonta y col., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 14662-14663; Z. Zhang y col., Biochemistry, 2003, 42, 6735-6746). Esta metodología también puede usarse para preparar proteínas con aminoácidos que contienen tetrazol directamente o proteínas con un aminoácido no natural que posibilita una fácil derivatización química. Estos podrían ser, por ejemplo, aminoácidos que contienen un grupo formilo, un grupo ceto, un grupo azido, un grupo mercapto, un grupo alcoxilamino, un grupo hidrazino, un alquino, un alqueno, un yoduro de arilo, o un bromuro de arilo. La proteína resultante, que contiene este aminoácido no natural, después puede convertirse en una proteína que contiene tetrazol mediante unión covalente de un derivado adecuado de tetrazol a la cadena lateral del aminoácido no natural.

Los polipéptidos pueden contener una o varias tirosinas. Estas pueden derivatizarse selectivamente por acoplamiento azo con una sal de arildiazonio. Esta técnica también puede usarse para preparar compuestos de acuerdo con la presente invención, tratando dicho polipéptido que contiene tirosina con una sal de arildiazonio que contiene tetrazol.

En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de fórmula general (I):



en la que

G, X e Y representan independientemente un enlace, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₀-, o

arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano y

Z representa un enlace o

-(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂-(CF₂)_n-, en los que n es 1-40 y

A representa

-C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, o

-O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)- y

Q representa un enlace o

-[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, o

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, o

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y

R representa un enlace o un poli-radical, tal como [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅ y

t es 1-40 y

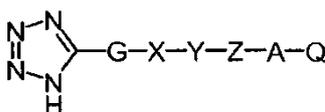
el término 'molécula' se define como en la presente reivindicación 1.

En una realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que G, X e Y son todos un enlace.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que G, X e Y se seleccionan todos de -(CH₂)₁₋₁₀-.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que t es 1.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que



es 16-(5-tetrazolil)hexadecanoilo,

4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butirilo,

5 2-(2-(2-(16-(tetrazol-5-il)(hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetilo) carbamoilmetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi)etil]amida del ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico. o [2-(2-{2-(2-

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en la que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo ε-amino de un residuo de lisina.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo tiol de un residuo de cisteína.

10 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un agente terapéutico.

En otro aspecto la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que el agente terapéutico es un biopolímero.

15 En otro aspecto la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que el agente terapéutico es un polipéptido.

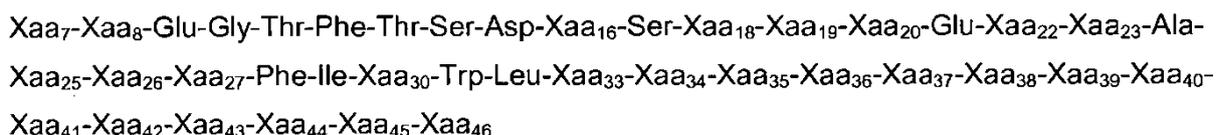
En otro aspecto la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que el agente terapéutico es un fármaco de molécula pequeña.

En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que el agente terapéutico es un polipéptido que es un péptido insulínico.

20 En una realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que es GLP-1 (7-37) o una variante del mismo.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que es GLP-1 (7-37) o un análogo del mismo.

25 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula (IV):



Fórmula (III) (SEQ ID N.º: 3)

en la que

30 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, ácido 2-amino-3-(2-aminoimidazol-4-il)propiónico, β-hidroxihistidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico, ácido 1-aminociclobutanocarboxílico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico, ácido 1-aminocicloheptanocarboxílico, o ácido 1-aminociclooctanocarboxílico;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

35 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

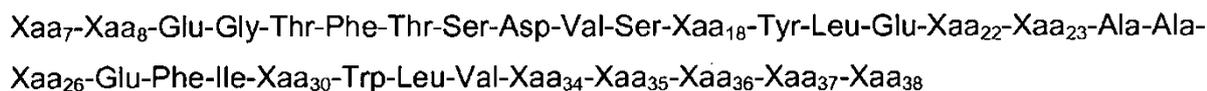
Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;
- Xaa₂₇ es Glu o Leu;
- 5 Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;
- Xaa₃₃ es Val o Lys;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly o Aib; Xaa₃₆ es Arg, Gly o Lys;
- Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente;
- 10 Xaa₃₈ es Lys, Ser, amida o está ausente;
- Xaa₃₉ es Ser, Lys, amida o está ausente;
- Xaa₄₀ es Gly, amida o está ausente;
- Xaa₄₁ es Ala, amida o está ausente;
- Xaa₄₂ es Pro, amida o está ausente;
- 15 Xaa₄₃ es Pro, amida o está ausente;
- Xaa₄₄ es Pro, amida o está ausente;
- Xaa₄₅ es Ser, amida o está ausente;
- Xaa₄₆ es amida o está ausente;
- 20 con la condición de que si Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ o Xaa₄₆ está ausente entonces cada residuo de aminoácido cadena abajo también estará ausente.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula (V):



Fórmula (IV) (SEQ ID N.º: 4)

en la que

- 25 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico, ácido 1-aminociclobutanocarboxílico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico, ácido 1-aminocicloheptanocarboxílico, o ácido 1-aminociclooctanocarboxílico;
- 30 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
- Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;
- Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;
- 35 Xaa₃₄ es Lys, Glu o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg o Lys;

Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu o Lys;

Xaa₃₈ es Lys, amida o está ausente.

5 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido seleccionado entre GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-36)-amida, GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-38), GLP-1 (7-39), GLP-1 (7-40), GLP-1(7-41) o un análogo de los mismos.

10 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende no más de quince residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o deleccionado en comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID N.º: 1), o no más de diez residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o deleccionado en comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID N.º: 1).

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende no más de seis residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o deleccionado en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID N.º: 1).

15 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende no más de 4 residuos de aminoácido que no están codificados por el código genético.

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que es un péptido insulínico protegido de DPP-IV.

En otra realización la invención desvela a compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un polipéptido que comprende un residuo Aib en la posición 8.

20 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un análogo de GLP-1 (7-37) en el que el residuo de aminoácido en la posición 7 de dicho polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en D-histidina, desamino-histidina, ácido 2-amino-3-(2-aminoimidazol-4-il)propiónico, β-hidroxi-histidina, homohistidina, Nα-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4-piridilalanina.

25 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un análogo de GLP-1 (7-37) seleccionado entre el grupo que consiste en Arg³⁴GLP-1 (7-37), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1 (7-36), Aib^{8,22,35} GLP-1 (7-37), Aib^{8,35} GLP-1 (7-37), Aib^{8,22} GLP-1 (7-37), Aib^{8,22,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22,35} Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35} Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35} Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1 (7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35} Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1 (7-37) y Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1 (7-38).

30 En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es GLP-1 (7-37) o un análogo del mismo que se une a R mediante el residuo de aminoácido en la posición 23, 26, 34, 36 o 38 respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N.º: 1.

35 En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es exendina-4(1-39) o un análogo de la misma.

40 En una realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es un análogo de exendina-4 que comprende no más de doce residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o deleccionado en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2), o no más de ocho residuos de aminoácido que se han cambiado, añadido o deleccionado en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2).

En otra realización la invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es ZP-10, es decir,

HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-amida (SEQ ID N.º: 5).

45 En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es hormona del crecimiento humana o un análogo de la misma.

En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es insulina humana o un análogo de la misma.

50 En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es factor VII o un análogo del mismo.

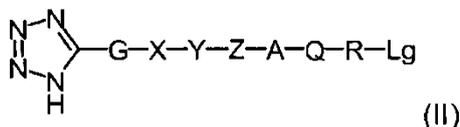
En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es hormona paratiroidea o un análogo de la misma.

En otro aspecto la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula es hormona foliculo-estimulante humana o un análogo de la misma.

- 5 En otra realización la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula tiene un peso molar de menos de 100 kDa, menos de 50 kDa, o menos de 10 kDa.

En otros aspectos la presente invención desvela un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que la molécula se selecciona entre el grupo que consiste en un factor de crecimiento tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), una somatomedina tal como factor de crecimiento I tipo insulina (IGF-I), factor de crecimiento II tipo insulina (IGF-II), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) o angiopoyetina, interferón, pro-urocinasa, urocinasa, activador de plasminógeno tisular (t-PA), inhibidor 1 del activador de plasminógeno, inhibidor 2 del activador de plasminógeno, factor de von Willebrandt, una citocina, por ejemplo, una interleucina tal como interleucina (IL) 1, IL-1 Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20 o IL-21, un factor estimulador de colonias (CFS) tal como GM-CSF, factor de células madre, un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α , linfotóxina- α , linfotóxina- β , CD40L, o CD30L, un inhibidor de proteasa, por ejemplo, aprotinina, una enzima tal como superóxido dismutasa, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, catalasa, uricasa, bilirrubina oxidasa, tripsina, papaína, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, nucleósido fosforilasa de purina o batroxobina, un opioide, por ejemplo, endorfinas, encefalinas u opioides no naturales, una hormona o neuropéptido, por ejemplo, calcitonina, glucagón, gastrinas, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), colecistoquininas, hormona luteinizante, hormona liberadora de gonadotropina, gonadotropina coriónica, factor liberador de corticotropina, vasopresina, oxitocina, hormonas antidiuréticas, hormona estimuladora de tiroides, hormona liberadora de tirotropina, relaxina, prolactina, péptido YY, neuropéptido Y, polipéptido pancreático, leptina, CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), un péptido relacionado con CART, perilipina, melanocortinas (hormonas estimuladoras de melanocitos) tales como MC-4, hormonas de concentración de melanina, péptidos natriuréticos, adrenomedulina, endotelina, secretina, amilina, péptido vasoactivo intestinal (VIP), polipéptido activador de adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP), bombesina, péptidos tipo bombesina, timosina, proteína de unión a heparina, CD4 soluble, factor liberador hipotalámico, melanotoninas y análogos de los mismos.

- 30 En otro aspecto, la presente invención desvela un compuesto de fórmula general (II):



en la que G, X, Y, Z, A, Q y R representan grupos definidos en la reivindicación 3 y Lg es un grupo saliente, tal como Cl, Br, I, OH, -OSO₂Me, -OSO₂CF₃, -OTs, -SMe₂, -OSu, -OBt, -OAt, -OPh, o -O(4-NO₂)Ph.

- 35 En otro aspecto la presente invención desvela el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (II) para la síntesis de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I).

Los polipéptidos terapéuticos pueden producirse por síntesis peptídica clásica, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida usando química t-Boc o F-Moc u otras técnicas bien establecidas, véase, por ejemplo, Green y Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999.

- 40 Los polipéptidos terapéuticos también pueden producirse por un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión del péptido, después de lo cual se recupera el péptido resultante del cultivo.

- 45 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar las células huésped, tal como medio mínimo o complejo que contiene suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células puede recuperarse después del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración. Para productos extracelulares, los componentes proteicos del sobrenadante se aíslan por filtración, cromatografía en columna o precipitación, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración, precipitación isoelectrónica, purificación por una diversidad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión. Para productos intracelulares o periplasmáticos, las células aisladas del medio de cultivo se disgregan o permeabilizan y se extraen para recuperar el polipéptido o precursor del mismo producido.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido terapéutico puede ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenido preparando una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del péptido por hibridación usando sondas oligonucleotídicas sintéticas de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el polipéptido también puede prepararse de forma sintética por procedimientos convencionales establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4.683.202 o Saiki y col., Science 239 (1988), 487 - 491.

La secuencia de ADN puede insertarse en cualquier vector que pueda someterse de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la que tiene que introducirse. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en que se ha integrado.

El vector es preferentemente un vector de expresión en que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido está unida de forma funcional a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tales como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una diversidad de células huésped se conocen bien en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook y col., *supra*.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido también puede conectarse de forma funcional, si fuera necesario, a un terminador adecuado, a señales de poliadenilación, a secuencias potenciadoras de la transcripción y a secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia de ADN que posibilite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

El vector también puede comprender un marcador de selección, por ejemplo, un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que confiera resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. Para fabricación a gran escala, el marcador de selección preferentemente no es resistencia a antibiótico, por ejemplo, los genes de resistencia a antibióticos en el vector se escinden preferentemente cuando el vector se usa para fabricación a gran escala. Los procedimientos para eliminar los genes de resistencia a antibióticos de vectores se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, el documento US 6.358.705 que se incorpora en el presente documento por referencia.

Para dirigir un péptido precursor de la presente invención a la vía de secreción de las células huésped, puede proporcionarse una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en la fase de lectura correcta. Las secuencias señal secretoras habitualmente se posicionan 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la normalmente asociada con el péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína secretada.

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el presente péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, se conocen bien por las personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook y col., *supra*).

La célula huésped en que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el presente péptido e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Ejemplos de células huésped adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares BHK o CHO de mamífero.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención que está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml y en el que dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender adicionalmente un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de isotonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En una realización de la invención la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 50 % p/p de agua.

Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos un 50 % p/p de agua y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50 % p/p de agua.

5 En otra realización la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelación, a la cual el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

En otra realización la formulación farmacéutica es una formulación secada (por ejemplo, secada por congelación o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución anterior.

10 En un aspecto adicional la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un tampón, en la que dicho compuesto está presente en una concentración de 0,1 mg/ml o superior y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

15 En un aspecto adicional la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un tampón, en la que dicho compuesto está presente en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o superior y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5.

20 En otra realización adicional de la invención el pH de la formulación se selecciona entre la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

25 En una realización adicional de la invención, el tampón se selecciona entre el grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

30 En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención el conservante se selecciona entre el grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas se conoce bien por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

40 En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un agente isotónico. En una realización adicional de la invención el agente isotónico se selecciona entre el grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o mezclas de los mismos. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo --OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galacititol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No existe límite fijo a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes conseguidos usando los procedimientos de la invención. En una realización, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas se conoce bien por la persona experta. Por conveniencia se hace

referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un agente quelante. En una realización adicional de la invención el agente quelante se selecciona entre sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas se conoce bien por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas se conoce bien por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente muestra formación de agregados durante su almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas de polipéptido que provoca la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o de agregados visibles grandes que precipitan en la solución. Por "durante almacenamiento" se entiende que una composición o formulación farmacéutica líquida una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, después de la preparación, se envasa para almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado, o en una forma secada para posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un sujeto. Por "forma secada" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca por secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, R.U.), pág. 491-676; Broadhead y col. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18: 1169-1206; y Mumenthaler y col. (1994) Pharm. Res. 11: 12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25: 459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4: 47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, provocando pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como bloqueo de conductos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos a usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Puede estar presente cualquier estereoisómero (es decir, isómeros R o S - o isómero L, D o DL) de un aminoácido particular (por ejemplo, alanina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros, en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. En una realización, se usa el estereoisómero L, que indica la forma más abundante de aminoácidos. La forma L puede ser un isómero R o S dependiente del aminoácido específico. Las composiciones de la invención también pueden formularse con análogos de estos aminoácidos. Por "análogos de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que produce el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos adecuados de arginina incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos adecuados de metionina incluyen S-etil homocisteína y S-butil homocisteína y los análogos adecuados de cisteína incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o su forma de sal. En una realización adicional de la invención los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración, que es suficiente para impedir o retardar la agregación de la proteína.

En una realización adicional de la invención puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácido que contengan azufre) para inhibir la oxidación de residuos de metionina en sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a dicha oxidación. Por "inhibir" se desea acumulación mínima de especies de metionina oxidada en el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina provoca mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D, o DL) o combinaciones de los mismos. La cantidad a añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de

metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto puede conseguirse añadiendo metionina de modo que la proporción de metionina añadida a residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un estabilizante seleccionado entre el grupo de polímeros de alto peso molecular o de compuestos de bajo peso molecular. En una realización adicional de la invención el estabilizante se selecciona entre polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxixelulosa o derivados de la misma (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol y diferentes sales (por ejemplo, cloruro sódico). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en las mismas. Los agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, aunque sin limitación, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido contra oxidación de metionina y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada con congelación-descongelación o corte mecánico.

En una realización adicional de la invención la formulación comprende adicionalmente un tensioactivo. En una realización adicional de la invención el tensioactivo se selecciona entre un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Tritón X-100), ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, derivados de polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres de palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (éter alquílico) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol y los cargados positivamente DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglucolípidos (por ejemplo galactopiránósido), esfingoglucolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato sódico etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados en la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^α-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^α-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sódico, n.º: de registro CAS [577-11-7]), docusato cálcico, n.º: de registro CAS [128-49-4]), docusato potásico, n.º: de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato sódico o lauril sulfato sódico), caprilato sódico, ácido cólico o derivados del mismo, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-arilo-sulfonatos), tensioactivos híbridos (por ejemplo, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil β-D-glucopiránósido), poloxaminas (por ejemplo, de Tetric), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencia de óxido de propileno y óxido de etileno en etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse entre el grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas se conoce bien por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, 1995.

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

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por

ejemplo, la piel y sitios de mucosa, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, la administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

5 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o de una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

10 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, tiritas, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina duras y cápsulas de gelatina blandas, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizaciones, polvo, aerosoles, inhalantes, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución de inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo, gelificantes in situ, de fijación in situ, de precipitación in situ, de cristalización in situ, solución de infusión e implantes.

15 Las composiciones de la invención pueden estar compuestas adicionalmente en, o unidas a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo de fármaco, un sistema de suministro de fármacos y un sistema avanzado de suministro de fármacos para potenciar adicionalmente la estabilidad del compuesto, incrementar la biodisponibilidad, incrementar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los especialistas en la técnica e incrementar la conformidad por parte del paciente o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de vehículos, sistemas de suministro de fármacos y sistemas avanzados de suministro de fármacos, incluyen, 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 de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas de vehículo, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los especialistas en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma, bien conocidos por los especialistas en la técnica de comportamiento de fase en sistemas de lípidos-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, auto-emulsionantes, auto-microemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de las mismas y dendrímeros.

20 25 30 Las composiciones de la presente invención son útiles para la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar del compuesto usando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos dispositivos bien conocidos para los especialistas en la técnica.

35 40 Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de suministro de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, aunque sin limitación, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas parenterales de liberación controlada y liberación sostenida (conduciendo ambos sistemas a una reducción de muchas veces en la cantidad de administraciones), bien conocidos para los especialistas en la técnica. Incluso más preferentemente, los sistemas de liberación controlada y liberación sostenida se administran por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, ejemplos de sistemas y composiciones útiles de liberación controlada son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas,

45 Los procedimientos para producir sistemas de liberación controlada útiles para composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y procedimientos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

50 55 La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Como alternativa, la administración parenteral puede realizarse mediante una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto de acuerdo con la presente invención en forma de un pulverizador nasal o pulmonar. Como otra opción adicional más, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención también pueden adaptarse para administración transdérmica, por ejemplo mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o a través de la mucosa, por ejemplo administración bucal.

La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas.

La expresión "estabilidad física" de la formulación proteica como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con interfaces y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas se evalúa mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la formulación 5 llenada en recipientes adecuados (por ejemplo cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo agitación) a diferentes temperaturas durante diversos periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz definida y enfocada con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por un valor visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez 10 corresponde a un valor visual 0 y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponda a valor visual 3). Una formulación se clasifica inestable física con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación puede evaluarse por mediciones simples de turbidez bien conocidas para los especialistas en la técnica. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas también puede evaluarse usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional 15 de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura proteica es Tioflavina T. La Tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas y quizá otras configuraciones proteicas también, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma proteica fibrilar. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de 20 onda.

Pueden usarse otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura proteica de estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parches hidrófobos" que se unen preferentemente a parches hidrófobos 25 expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos están generalmente enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos según una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes aromáticos e hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos metálicos de cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina.

La expresión "estabilidad química" de la formulación proteica como se usa en el presente documento se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura proteica que conducen a la formación de productos de degradación 30 química con posible menor potencia biológica y/o posible aumento en las propiedades inmunógenas en comparación con la estructura proteica nativa. Pueden formarse diversos productos de degradación química dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el entorno al cual se expone la proteína. La eliminación de degradación química muy probablemente no podrá evitarse completamente y a menudo se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y uso de la formulación proteica como bien saben los 35 especialistas en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a desamidación, un procedimiento en el cual el grupo amida de cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas proteicas se unen covalentemente entre sí a través de transamidación y/o interacciones 40 disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. y Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación proteica puede evaluarse midiendo la cantidad de los productos de 45 degradación química en diversos momentos puntuales después de exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación a menudo puede acelerarse aumentando por ejemplo la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación química individual a menudo se determina mediante separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño de la molécula y/o la carga usando diversas técnicas cromatográficas (por ejemplo, SEQ-HPLC y/o RP-HPLC).

Por tanto, como se ha descrito anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con 50 estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (en cumplimiento de las condiciones recomendadas de uso y almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de caducidad.

En una realización de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la 55 presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una realización adicional de la invención la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de 60 almacenamiento.

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

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

5 En una realización de la invención un compuesto de acuerdo con la invención en el que el agente terapéutico es un péptido GLP-1 se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos asociados con hipervolemia tóxica, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria, apoplejía y otros trastornos cardiovasculares, síndrome inflamatorio del intestino, dispepsia y úlceras gástricas.

10 En otra realización de la invención un compuesto de acuerdo con la invención en el que el agente terapéutico es un péptido GLP-1 se usa para la preparación de un medicamento para retardar o impedir la progresión de la enfermedad en diabetes tipo 2.

15 En otra realización de la invención un compuesto de acuerdo con la invención en el que el agente terapéutico es un péptido GLP-1 se usa para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β , estimular la generación de células β y/o para restaurar la sensibilidad a glucosa en las células β .

20 En otra realización la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención en el que el agente terapéutico es un péptido GLP-2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de síndrome del intestino delgado, síndrome inflamatorio del intestino o enfermedad de Crohn.

En otra realización la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención en el que el agente terapéutico es un péptido de insulina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hiperglucemia, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 o deficiencia de células β .

25 El tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención también puede combinarse con una segunda o más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con obesidad. Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: Insulina, agonistas de GLP-1, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), compuestos que disminuyen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozilo, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueantes β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazeprilo, captoprilo, enalaprilo, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueantes del canal de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicaldipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil y bloqueantes α tales como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de $\beta 3$, agonistas de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos de serotonina y noradrenérgicos mixtos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína de desacoplamiento 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor X retinoide), agonistas de TR β ; antagonistas de histamina H3, gastrina y análogos de gastrina.

Ejemplos

En los ejemplos los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados generales:

Boc: terc-butiloxicarbonilo
 Bt: 1-benzotriazolilo
 55 DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

- DCM: diclorometano, cloruro de metileno
- Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
- DIC: diisopropilcarbodiimida
- DMA: N,N-dimetilacetamida
- 5 DMF: N,N-dimetil formamida
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMAP: 4-dimetilaminopiridina
- DMPU: 1,3-dimetiltetrahidropirimidin-2-ona
- EDC o EDAC clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- 10 Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
- HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1 H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio
- HOAt: 3-hidroxi-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina, 4-aza-3-hidroxi-1,2,4-triazol-5(4H)-ilidina
- HOBt: N-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro-1,2,4-triazol-5(4H)-ilidina
- HONSu: N-hidroxisuccinimida
- 15 NMP: N-metilpirrolidona
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión
- Pmc 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
- t.a. temperatura ambiente
- Su: succinimidilo
- 20 TIS triisopropilsilano
- Trt: tritilo, trifenilmetilo
- Ts: toluenosulfonilo
- TSTU hexafluorofosfato de O-(1-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- DIEA diisopropiletilamina
- 25 H₂O agua
- CH₃CN acetonitrilo
- OtBu éster terc-butílico
- tBu terc-butilo
- Trt trifenilmetilo
- Pmc 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
- 30 Dde 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
- DCM diclorometano
- TFA: ácido trifluoroacético
- Et₂O: dietiléter

35 Los espectros de RMN se registraron en instrumentos Bruker 300 MHz y 400 MHz. HPLC-EM se realizó en un instrumento Perkin Elmer (API 100).

Se usaron sistemas de HPLC de Merck-Hitachi (Hibar™ RT 250-4, Lichrosorb™ RP 18, 5,0 mm, 4,0 x 250 mm, elución en gradiente, 20 % a 80 % de acetonitrilo en agua en 30 min, 1,0 ml/min, detección a 254 nm) y Waters (Symmetry™, C18, 3,5 mm, 3,0 x 150 mm, elución en gradiente, 5 % a 90 % de acetonitrilo en agua en 15 min, 1,0

ml/min, detección a 214 nm). Además, donde se indica se usó el siguiente procedimiento de HPLC h8:

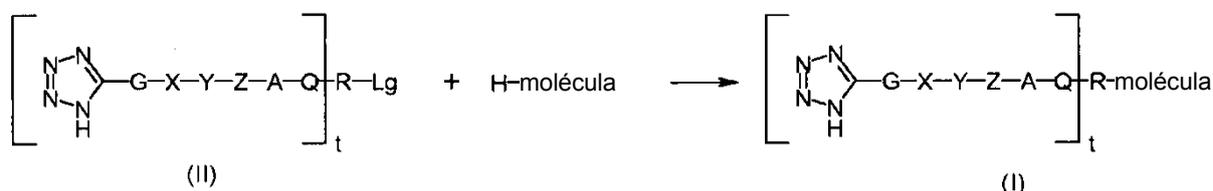
El análisis en fase inversa se realizó usando detecciones de UV a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna de sílice 218TP54 de 4,6 mm x 150 mm C-18, que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con acetonitrilo al 5 %, agua al 85 % y 10 % de una solución de ácido trifluoroacético al 0,5 % en agua y se eluyó mediante un gradiente lineal del 5 % de acetonitrilo, 85 % de agua y 10 % de una solución de ácido trifluoroacético al 0,5 % hasta acetonitrilo al 90 % y 10 % de una solución de ácido trifluoroacético al 0,5 % en 15 min.

Además, donde se indica se usó el siguiente procedimiento de HPLC A:

El análisis RP se realizó usando sistemas Waters 2690 equipados con un detector de serie de diodos Waters 996. Las detecciones de UV se recogieron a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna de sílice 218TP54 de 4,6 mm x 250 mm 5m C-18 (The Separations Group, Hesperia), que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con acetonitrilo al 5 % (+ TFA al 0,1 %) en una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %). Después de la inyección, la muestra se eluyó mediante un gradiente del 0 % al 90 % de acetonitrilo (+ TFA al 0,1 %) en una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %) durante 50 min.

Procedimiento general (A)

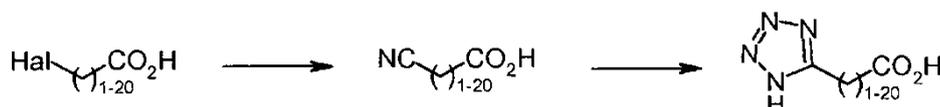
Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención pueden prepararse por el procedimiento general (A):



Se disuelve una molécula de la cual se requiere una semi-vida prolongada en plasma y que contiene al menos un grupo amino acilable en un disolvente adecuado (agua, alcoholes, DMF, DMSO, DMPU, o mezclas de los mismos) y se añade una solución o suspensión de (II) en DMF o DMSO. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se sigue el progreso de la reacción por HPLC. Si la reacción procede demasiado lentamente, pueden añadirse cantidades catalíticas de DMAP. El producto se aísla por HPLC preparativa de la mezcla de reacción completa.

Procedimiento general (B)

Los compuestos de fórmula (II) de acuerdo con la invención pueden prepararse por el procedimiento general (B):

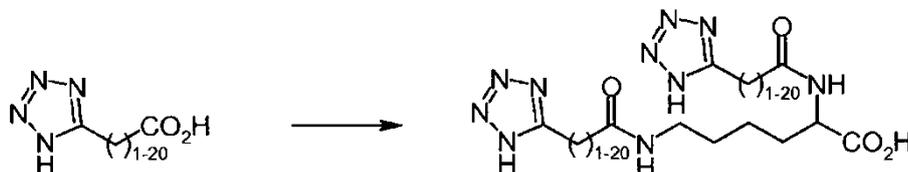


Se trata un ácido o éster ω-haloalcanoico con un ligero exceso de NaCN o KCN en un disolvente adecuado, tal como DMF, DMSO, acetona, o un alcohol hasta que ha tenido lugar la conversión completa en el nitrilo. La reacción se sigue analizando muestras por RMN de ¹H. El ácido o éster ω-cianoalcanoico resultante se aísla por dilución con agua y extracción con AcOEt o DCM. El tratamiento de este ácido o éster ω-cianoalcanoico con NaN₃ en presencia de AcOH y NEt₃ en DMF a 140 °C hasta que todo el material de partida está consumido (determinado por RMN de ¹H) proporciona el correspondiente ácido o éster ω-(5-tetrazolil)alcanoico. En el caso del éster, se convierte en el ácido por tratamiento con un exceso de NaOH o KOH en una mezcla de agua y un alcohol. La evaporación del alcohol y la adición de HCl acuoso diluido proporciona el ácido ω-(5-tetrazolil)alcanoico, que puede aislarse por filtración.

Como alternativa, el procedimiento general (B) también puede realizarse con un éster ω-halo alcanoico en lugar de un ácido. La saponificación del éster ω-(tetrazol-5-il)alcanoico resultante en el correspondiente ácido puede realizarse por tratamiento con un exceso de KOH o NaOH en una mezcla de agua y etanol.

Procedimiento general (C)

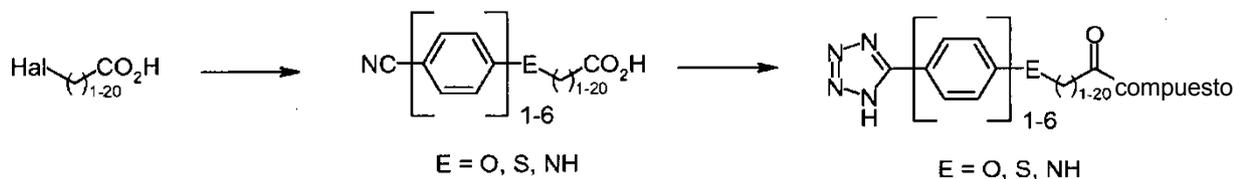
Los compuestos de fórmula (II) de acuerdo con la invención pueden prepararse por el procedimiento general (C):



Un ácido ω -(5-tetrazolil)alcanoico se convierte en un haluro de acilo o éster de N-hidroxisuccinimido y después se acopla a metil éster de lisina. La saponificación del producto resultante proporciona N,N'-bis(ω -(5-tetrazolil)alcanoil)lisina.

Procedimiento general (D)

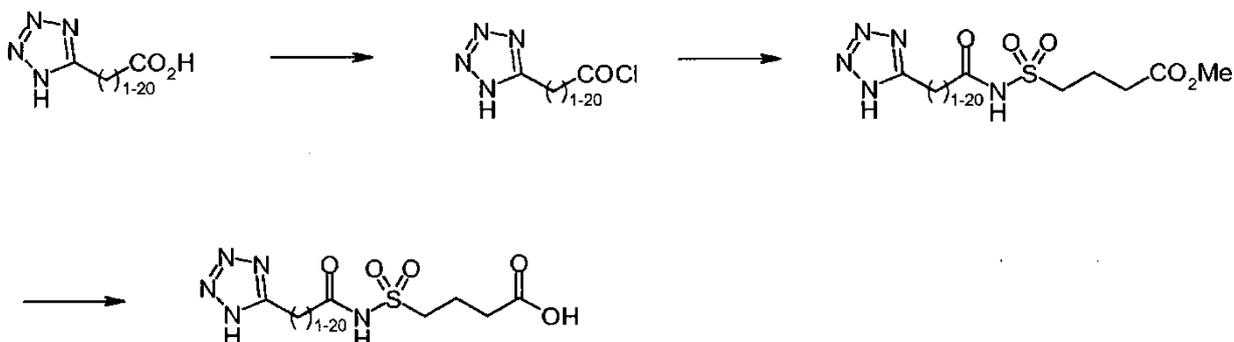
- 5 Los compuestos de fórmula (II) de acuerdo con la invención pueden prepararse por el procedimiento general (D):



- 10 Un ácido o éster ω -haloalcanoico se trata con un cianofenol, cianotiofenol, dicianofenol, cianobifenilol, cianoterfenilol, cianoanilina, cianohidroxiheteroareno, o un reactivo relacionado que contiene al menos un grupo ciano y un grupo hidroxilo unido a areno o heteroareno en presencia de una base tal como K_2CO_3 o DBU en un disolvente adecuado, tal como DMF, DMSO, acetona, o un alcohol hasta que ha tenido lugar la conversión completa en el aril o heteroariléter, -tioéter, o -amina. La reacción se sigue analizando muestras por RMN de 1H . El ácido o éster ω -ariloxi-, ω -arilitio-, o ω -ariloaminoalcanoico resultante se aísla por dilución con agua y extracción con AcOEt o DCM.
- 15 El tratamiento de este producto con NaN_3 en presencia de AcOH y NEt_3 en DMF a $140^\circ C$ hasta que todos el material de partida está consumido (determinado por RMN de 1H) proporciona el correspondiente ácido o éster ω -(5-tetrazolil)ariloxi-, ω -(5-tetrazolil)arilitio-, o ω -(5-tetrazolil)arilaminoalcanoico. En el caso del éster, se convierte en el ácido por tratamiento con un exceso de NaOH o KOH en una mezcla de agua y un alcohol. La evaporación del alcohol y la adición de HCl acuoso diluido proporciona el ácido alcanoico funcionalizado con ω -(5-tetrazolil), que puede aislarse por filtración.

Procedimiento general (E)

- 20 Los compuestos de fórmula (II) de acuerdo con la invención pueden prepararse por el procedimiento general (E):



- 25 Un ácido ω -(5-tetrazolil)alcanoico o ácido relacionado se convierte en un haluro de acilo y después se trata con éster metílico del ácido 4-(sulfamoil)butírico y DMAP en un disolvente adecuado, tal como DCM o DCE. El éster metílico del ácido 4-(N-(ω -(5-tetrazolil)alcanoil)sulfamoil)butírico resultante se saponifica con el correspondiente ácido por tratamiento con un exceso de KOH o NaOH en una mezcla de agua y metanol.

Procedimiento general (F)

Síntesis en fase sólida, purificación y caracterización de péptidos y péptidos derivatizados:

- 30 Los péptidos se sintetizaron en resina de amida Rink protegida con Fmoc (Novabiochem), resina Wang protegida con Fmoc o resina de clorotritilo usando estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A en escala de 0,25 mmol usando los protocolos de FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean acoplamiento mediados por HBTU en NMP y control por UV de la desprotección del grupo de protección Fmoc. Los derivados de aminoácido protegidos usados fueron Fmoc-aminoácidos convencionales (Anaspec) suministrados en cartuchos pre-pesados adecuados para el sintetizador ABI 433A con la excepción de aminoácidos no naturales tales como Fmoc-Aib-OH (Fmoc-ácido aminoisobutírico).

- 35 La unión de cadenas laterales y enlazadores a residuos específicos de lisina en el péptido protegido unido a la resina en bruto se realizó en una posición específica por incorporación de Fmoc-Lys(Dde)-OH durante la síntesis automatizada seguida de desprotección selectiva con hidrazina.

Procedimiento para la eliminación de protección Dde. La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato de agitación/filtración manual y se trató con hidrazina al 2 % en NMP (20 ml, 2 x 12 min) para eliminar el grupo DDE y

lavar con NMP (4x20 ml).

5 Procedimiento para la unión de cadenas laterales a residuos de lisina. El aminoácido (4 equivalentes molares respecto a la resina) se disolvió en NMP (10 ml). Se añadieron HOBt (4 equivalentes molares respecto a la resina) y diisopropilcarbodiimida (4 equivalentes molares respecto a la resina) y la solución se agitó durante 15 min. La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares respecto a la resina). La resina se agitó 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2 x 20 ml), RMN/DCM (1:1; 2 x 20ml) y DCM (2 x 20 ml).

10 Procedimiento para la eliminación de protección Fmoc. La resina (0,25 mmol) se colocó en un matraz con filtro en un aparato manual de agitación y se trató con NMP/DCM (1:1) (2 x 20 ml) y con NMP (20 ml), una solución de piperidina al 20 % en NMP (3 x 20 ml, 10 min cada uno). La resina se lavó con NMP (2 x 20 ml), NMP/DCM (1:1) (2 x 20ml) y DCM (2 x 20 ml).

Procedimiento para escindir el péptido de la resina:

15 El péptido se escindió de la resina agitando durante 180 min a temperatura ambiente con una mezcla de TFA, agua y triisopropilsilano (95:2,5:2,5). La mezcla de escisión se filtró y el filtrado se concentró en un aceite mediante un chorro de nitrógeno. El péptido en bruto se precipitó de este aceite con 45 ml de éter dietílico y se lavó 3 veces con 45 ml de éter dietílico.

Purificación: El péptido en bruto se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 25 mm x 250 mm compactada con sílice 5m C-18.

20 Después de secado, el péptido en bruto se disolvió en 5 ml de ácido acético H₂O al 50 % y se diluyó hasta 20 ml con H₂O y se inyectó en la columna que después se eluyó con un gradiente del 40-60 % de CH₃CN en TFA al 0,1 % 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Se recogieron las fracciones que contenían péptido. El péptido purificado se liofilizó después de dilución del eluato con agua.

El producto final obtenido se caracterizó por RP-HPLC analítica (tiempo de retención) y por CLEM

25 El análisis de RP-HPLC se realizó usando detección de UV a 214 nm y una columna de sílice Vydac 218TP54 de 4,6 mm x 250 mm 5m C-18 (The Separations Group, Hesperia, EEUU) que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. Se usaron dos condiciones diferentes de elución:

A1: Equilibrado de la columna con un tampón que consiste en (NH₄)₂SO₄ 0,1 M, que se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ concentrado y elución mediante un gradiente del 0 % al 60 % de CH₃CN en el mismo tampón durante 50 min.

B1: Equilibrado de la columna con TFA al 0,1 %/H₂O y elución mediante un gradiente del 0 % de CH₃CN /0,1 % de TFA / H₂O hasta 60 % de CH₃CN /0,1 % de TFA /H₂O durante 50 min.

30 B6: Equilibrado de la columna con TFA al 0,1 %/H₂O y elución mediante un gradiente del 0 % de CH₃CN /0,1 % de TFA / H₂O hasta 90 % de CH₃CN /0,1 % de TFA /H₂O durante 50 min.

35 Se realizó CLEM en una instalación que consistía en bomba de contenedor Hewlett Packard serie 1100 G1312A , compartimiento de columna Hewlett Packard serie 1100, detector de serie de diodos Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD, detector de dispersión de luz evaporativa Hewlett Packard serie 1100 MSD y Sedere 75 controlado por el software HP Chemstation. La bomba de HPLC se conecta a dos depósitos de eluyente que contienen:

A: NH₄OH 10 mM en agua

B: NH₄OH 10 mM en acetonitrilo al 90 %

El análisis se realizó a 23 °C inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 20 ml) en la columna que se eluye con un gradiente de A y B.

40 Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas usados se dan en la siguiente tabla.

Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm

Gradiente: 5 % - 100 % acetonitrilo lineal durante 6,5 min a 1,5 ml/min

Detección: 210 nm (salida analógica de DAD)

45 ELS: salida analógica de ELS

EM modo de ionización API-ES. Escáner 100-1000 uma etapa 0,1 uma

Procedimiento típico:

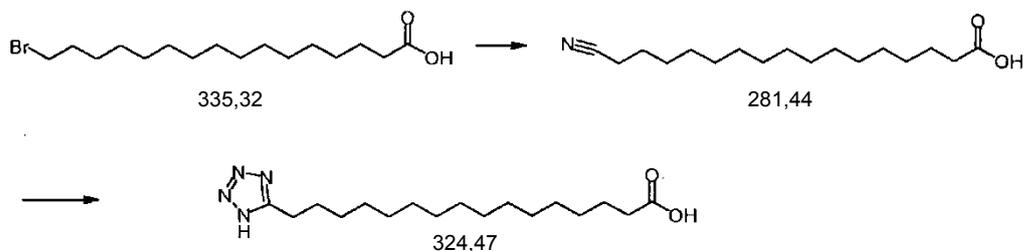
Se usó una resina (resina Fmoc-Gly-Wang, 0,6 mmol/g Novabiochem 0,25 mmol) para producir la secuencia primaria en una máquina ABI 433A de acuerdo con las directrices del fabricante. La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato manual de agitación/filtración y se trató con hidrazina al 2 % en NMP en (2x12 min. 2x20 ml) para eliminar el grupo Dde. La resina se lavó con NMP (4x20 ml). Se disolvió ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxoctanoico (Neosystem FA03202) (4 equivalentes molares respecto a la resina) en NMP/DCM (1:1, 20 ml). Se añadieron HOBt (4 equivalentes molares respecto a la resina) y DIC (4 equivalentes molares respecto a la resina) y la solución se agitó durante 15 min. La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares respecto a la resina). La resina se agitó 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (4x20 ml). Se añadió una solución de piperidina al 20 % en NMP (3x20 ml, 10 min cada una) a la resina con agitación. La resina se lavó con NMP (4x20 ml). Se disolvió éster de 16-(tetrazol-5-il)hexadecanoil-ONSu (4 equivalentes molares respecto a la resina) en NMP (20 ml). La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares respecto a la resina). La resina se agitó 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2x20 ml), NMP/DCM (1:1) (2x20ml) y DCM (2x20 ml). El péptido se escindió de la resina agitando durante 180 min a temperatura ambiente con una mezcla de TFA, agua y triisopropilsilano (95:2,5:2,5; 15 ml). La mezcla de escisión se filtró y el filtrado se concentró en un aceite en vacío. El péptido en bruto se precipitó de este aceite con 45 ml de éter dietílico y se lavó 3 veces con 45 ml de éter dietílico. El péptido en bruto se purificó por HPLC preparativa en una columna de 20 mm x 250 mm compactada con sílice 7 μ C-18. El péptido en bruto se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50 % en agua y se diluyó hasta 20 ml con H₂O y se inyectó en la columna que después se eluyó con un gradiente del 40-60 % (CH₃CN en agua con TFA al 0,1 %) 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Se recogieron las fracciones que contenían péptido. El péptido purificado se liofilizó después de dilución del eluato con agua.

Unión de radioligando a membranas plasmáticas que expresan el receptor de GLP-1 humano

El ensayo de unión se realizó con membranas plasmáticas purificadas que contenían el receptor de GLP-1 humano. Las membranas plasmáticas que contenían los receptores se purificaron de células BHK tk-ts 13 de expresión estable. Las membranas se diluyeron en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH=7,4) hasta una concentración final de 0,2 mg/ml de proteína y se distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pocillos pre-recubiertas con PEI al 0,3 %. Se incubaron membranas en presencia de [¹²⁵I]GLP-1 0,05 nM, ligandos no marcadores en concentraciones crecientes y diferentes concentraciones de HSA (0,005 %, 0,05 % y 2 %) 2 h a 30 °C. Después de la incubación, se separaron los ligandos no unidos de los ligandos unidos por filtración a través de un colector de vacío seguido de lavado 2X100 μ l con tampón de ensayo enfriado en hielo. Los filtros se secaron durante una noche a TA, se perforaron y se cuantificaron en un contador γ .

Ejemplo 1

Ácido 16-(5-tetrazolil)hexadecanoico



Una mezcla de ácido 16-bromohexadecanoico (16,61 g, 49,5 mmol), DMSO (150 ml), NaCN (12,5 g, 255 mmol) y NaI (1,92 g, 12,8 mmol) se agitó a 120 °C durante 20 h. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y después se vertió en una mezcla agitada de agua (1,7 l) y HCl concentrado (30 ml). Aclarado con agua (100 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto se filtró y se lavó con agua (2 x 100 ml) y el sólido se recrystalizó dos veces en MeCN (90 ml y 50 ml). Se obtuvieron 10,1 g (72 %) de ácido 16-cianohexadecanoico.

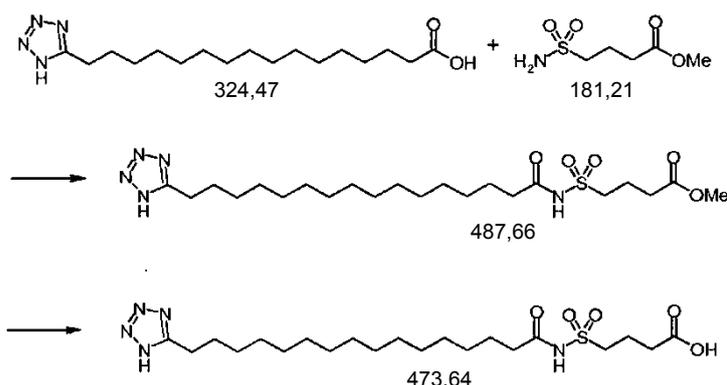
RMN de ¹H (DMSO) δ 1,20-1,39 (m, 22H), 1,50 (m, 4H), 2,18 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,48 (t, J = 7 Hz, 2H), 11,95 (s, 1 H).

Este producto se mezcló con DMF (150 ml), AcOH (10,0 ml, 174,8 mmol), NEt₃ (25 ml, 180 mmol) y NaN₃ (11,83 g, 182 mmol) y la mezcla se agitó a 120 °C durante 80 h, siguiendo la conversión al mismo tiempo por RMN de ¹H. La mezcla se concentró a presión reducida y al residuo se añadió agua (250 ml) y HCl concentrado (25 ml). La mezcla ácida se agitó a temperatura ambiente durante 2 d, se filtró y el sólido se recrystalizó en MeCN (aprox. 300 ml). Se obtuvieron 7,60 g (65 %) del compuesto del título.

RMN de ¹H (DMSO) δ 1,24 (m, 22H), 1,48 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 2,18 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,84 (t, J = 7 Hz, 2H), 11,95 (s, 1 H).

Ejemplo 2

Ácido 4-(N-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoil)sulfamoil)butírico

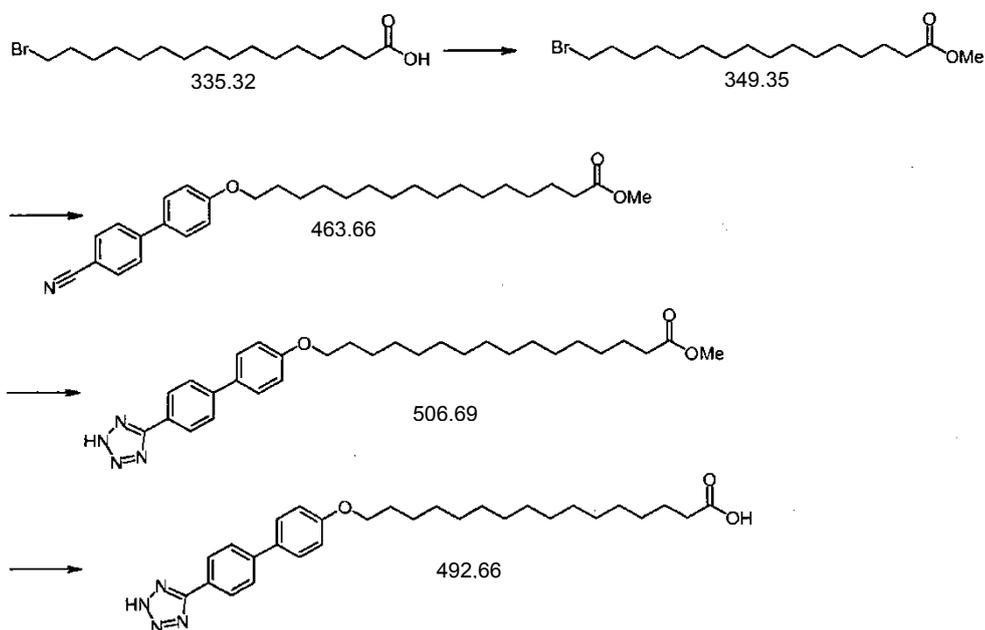


5 A una suspensión de ácido 16-(5-tetrazolil)hexadecanoico (3,25 g, 10,0 mmol) en DCM (40 ml) se añadió cloruro de oxalilo (1,2 ml, 14,0 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 42 h, se concentró, se coevaporó una vez con PhMe y al residuo se añadieron una solución de 4-sulfamoil butirato de metilo (1,66 g, 9,16 mmol) en DCM (35 ml) y después DMAP (3,67 g, 30,0 mmol). La mezcla heterogénea se agitó a temperatura ambiente durante

10 6,5 h y después se concentró. Al residuo se añadió una mezcla de agua (50 ml) y HCl 1 N (50 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 d. El producto se filtró, se lavó con agua (100 ml) y se recristalizó en MeCN (25 ml), para proporcionar 1,84 g (41 %) del éster metílico de N-acilsulfonamida. A este éster (1,06 g, 2,17 mmol) en MeOH (15 ml) se añadió una solución de NaOH (0,38 g, 9,5 mmol, 4,4 equiv.) en agua (1,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 h la mezcla se vertió en una mezcla de agua (80 ml) y HCl 1 N (20 ml). La mezcla se agitó durante 3 h, se filtró y el producto se secó a presión reducida. Se obtuvieron 1,09 g (100 %) del compuesto del título. RMN de ^1H (DMSO) δ 1,24 (m, 20H), 1,49 (m, 4H), 1,69 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,27 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,39 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,86 (t, J = 7 Hz, 2H), 3,38 (m, 2H), 11,59 (s, 1H).

Ejemplo 3

15 Ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico



Éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico:

20 Una mezcla de ácido 16-bromohexadecanoico (15,5 g, 46,2 mmol), MeOH (100 ml), PhMe (30 ml), trimetilortoformiato (30 ml) y ácido benenosulfónico unido a poliestireno (3,6 g) se agitó a 55 °C. Después de 69 h la mezcla se filtró a través de celite y el filtrado se concentró para proporcionar 16,85 g de un aceite (rendimiento del 100 %).

Éster metílico del ácido (4'-cianobifenil-4-iloxi)hexadecanoico:

25 Una mezcla de éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico (4,86 g, 13,9 mmol), MeCN (20 ml), 4-ciano-4'-hidroxi-bifenilo (3,16 g, 16,2 mmol) y K_2CO_3 (2,45 g, 17,7 mmol) se agitó a 82 °C. Después de 17 h se añadió NaHCO_3 acuoso saturado (150 ml) y el producto se filtró, se lavó con agua y se recristalizó en MeCN en ebullición

(aprox. 80 ml). La filtración y el secado a presión reducida proporcionaron 5,40 g (84 %) de agujas incoloras de éster metílico del ácido (4'-cianobifenil-4-iloxi)hexadecanoico.

Éster metílico del ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico:

5 Una mezcla de éster metílico del ácido (4'-cianobifenil-4-iloxi)hexadecanoico (2,75 g, 5,93 mmol), DMF (7,0 ml), NEt₃ (4,0 ml, 28,9 mmol), AcOH (1,75 ml, 29,1 mmol) y NaN₃ (2,50 g, 38,5 mmol) se agitó a 140 °C. Después de 17 h se añadieron agua (50 ml) y HCl 1 N (50 ml), seguido de acidificación con HCl conc. (aprox. 2 ml). El producto se filtró y recristalizó en MeCN/PhMe (aprox. 60 + 60 ml). La filtración y el secado a presión reducida proporcionaron 2,87 g (96 %) de éster metílico del ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico.

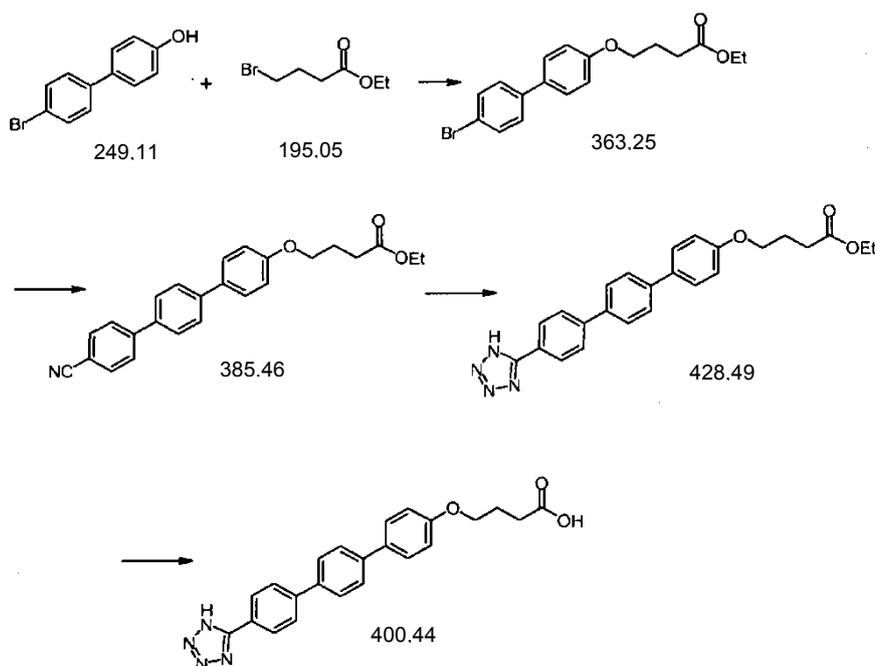
Ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico:

10 Una mezcla de éster metílico del ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico (2,87 g, 5,66 mmol), MeOH (30 ml) y una solución de NaOH (1,51 g, 37,8 mmol) en agua (2,0 ml) se agitó a 70 °C. Después de 4 d se añadieron agua (100 ml) y HCl 1 N (50 ml) y el producto se filtró, se lavó con agua, se coevaporó con MeCN/PhMe y se secó a presión reducida. Se obtuvieron 2,68 g (96 %) de ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico.

15 RMN de ¹H (DMSO) δ 1,20-1,50 (m, 24H), 1,72 (m, 2H), 2,18 (t, J = 7 Hz, 2H), 4,02 (t, J = 6 Hz, 2H), 7,04 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 8 Hz, 2H), 8,09 (d, J = 8 Hz, 2H), 11,95 (s a, 1 H).

Ejemplo 4

Ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4"-iloxi)butírico



Éster etílico del ácido 4-(4'-bromobifenil-4-iloxi)butírico:

20 Una mezcla de 4-(4-bromofenil)fenol (3,74 g, 15,0 mmol), MeCN (20 ml), 4-bromobutirato de etilo (4,42 g, 22,7 mmol) y K₂CO₃ (3,12 g, 22,6 mmol) se agitó a 80 °C.

Después de 16 h se añadieron agua (100 ml) y HCl 1 N (40 ml) y se extrajo el producto (3 x AcOEt), los extractos combinados se lavaron con salmuera (2x), se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El residuo se recristalizó en EtOH (40 ml) para proporcionar 4,35 g (80 %) de éster etílico del ácido 4-(4'-bromobifenil-4-iloxi)butírico en forma de placas incoloras.

25

Éster etílico del ácido 4-(4-ciano-[1,1',4',1'']-terfenil-4"-iloxi)butírico:

30 A éster etílico del ácido 4-(4'-bromobifenil-4-iloxi)butírico (2,03 g, 5,59 mmol) en tolueno (30 ml) y EtOH (20 ml) se añadieron trifetilfosfina (0,17 g, 0,65 mmol), ácido 4-cianofenilbórico (1,23 g, 8,37 mmol), Pd(OAc)₂ (65 mg, 0,29 mmol) y una solución de Na₂CO₃ (2,33 g, 22,0 mmol) en agua (10 ml). La mezcla se agita a 70 °C (temperatura del baño de aceite). Después de 66 h se añadieron agua (100 ml) y HCl 1 N (50 ml) y se extrajo el producto (3 x DCM). Los extractos combinados se lavaron con agua, después con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron y se concentraron para proporcionar 2,33 g de un sólido gris, que se lava con EtOH caliente y se seca a presión reducida.

para proporcionar 0,81 g (38 %) de éster etílico del ácido 4-(4-ciano-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico. De los lavados con etanol precipitó más producto (0,48 g, 22 %).

Éster etílico del ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico:

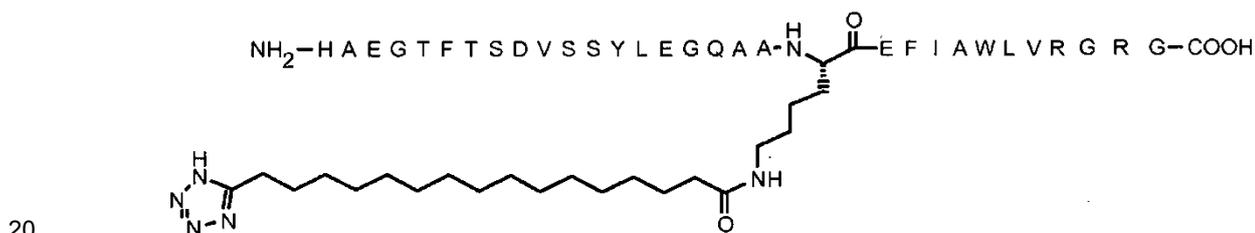
- 5 Una mezcla de éster etílico del ácido 4-(4-ciano-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico (1,29 g, 3,35 mmol), DMF (4,0 ml), NEt_3 (2,3 ml, 16,6 mmol), AcOH (1,0 ml, 16,7 mmol) y NaN_3 (1,32 g, 20,3 mmol) se agitó a 140 °C. Después de 20 h se añadieron agua (50 ml) y HCl 1 N (50 ml) y se aisló el producto por filtración, se lavó con MeCN caliente y se secó a presión reducida para proporcionar 1,16 g (81 %) de éster etílico del ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico en forma de un sólido gris.

Ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico

- 10 Una mezcla heterogénea de éster etílico del ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico (1,16 g, 2,71 mmol), EtOH (10 ml), NaOH (0,75 g, 18,8 mmol) y agua (1,5 ml) se agitó a 80 °C. Después de 18 h se añadieron agua (50 ml) y HCl 1 N (50 ml). Después de agitar durante 0,5 h el producto se filtró, se lavó con agua y el sólido se coevaporó con MeCN y PhMe para proporcionar 0,79 g (73 %) de ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico en forma de un polvo marrón claro.
- 15 RMN de ^1H (DMSO) δ 1,98 (quint, J = 7 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 7 Hz, 2H), 4,03 (t, J = 7 Hz, 2H), 7,04 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,77 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,85 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 8 Hz, 2H), 8,14 (d, J = 8 Hz, 2H), 12,19 (s a, 1 H).

Ejemplo comparativo 5

N- ϵ -26-(16-[5-tetrazolil]hexadecanoil)Arg³⁴GLP-1-(7-37)



- Este compuesto se preparó por acilación con ácido 16-[5-tetrazolil]hexadecanoico (Ejemplo 1) de péptido Arg³⁴GLP-1-(7-37) no protegido en solución. El succinimidil éster del ácido 16-[5-tetrazolil]hexadecanoico se preparó mezclando el ácido (29 mg) con THF (0,9 ml), DIPEA (17 microlitros) y TSTU (30 mg) y agitando la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 h. El Arg³⁴GLP-1-(7-37) (0,33 g, 30 % puro) se disolvió en agua (5 ml) y DIPEA (50 microlitros) y se añadió la solución del succinimidil éster (0,3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 min, se inactivó el exceso de succinimidil éster mediante la adición de un exceso de glicina y el producto se purificó por HPLC preparativa.
- 25

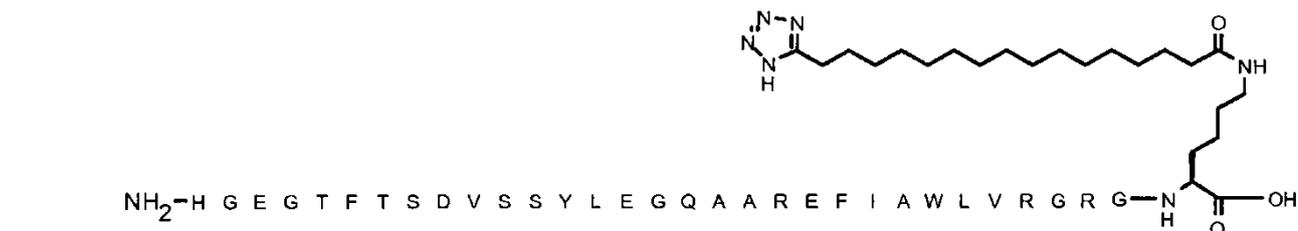
Se obtuvieron 38 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR= 9,36 min (100 %)

- 30 CLEM: m/z = 1231 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1231

Ejemplo comparativo 6

Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37)Lys(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilo)



Se preparó Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37) en un sintetizador de péptidos 433A usando metodología convencional de Fmoc y usando Fmoc-Lys(Boc)-tritol poliestireno (0,88 g, carga: 0,79 mmol/g) como resina de partida. Después de purificación por HPLC preparativa se obtuvieron 25 mg de péptido Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1 (7-37).

El compuesto del título se preparó por acilación del péptido Gly⁸,Arg^{26,34}GLP-1(7-37) (25 mg) con ácido 16-(5-

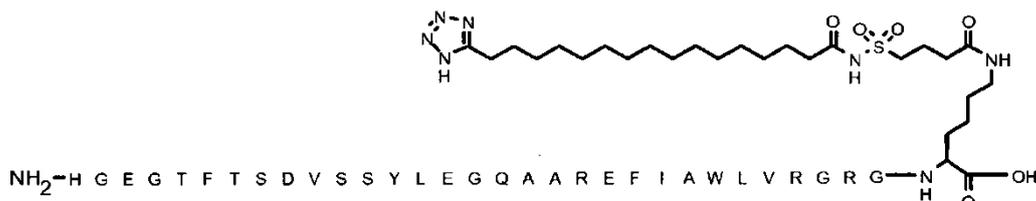
tetrazolil)hexadecanoico (23 mg) como se ha descrito para el Ejemplo 5. Se obtuvieron 14,6 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR= 9,02 min (99 %)

CLEM: m/z = 1279 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1279

5 Ejemplo comparativo 7

Péptido Gly⁸,Arg^{26,3a}GLP-1(7-37)Lys{4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butiril}



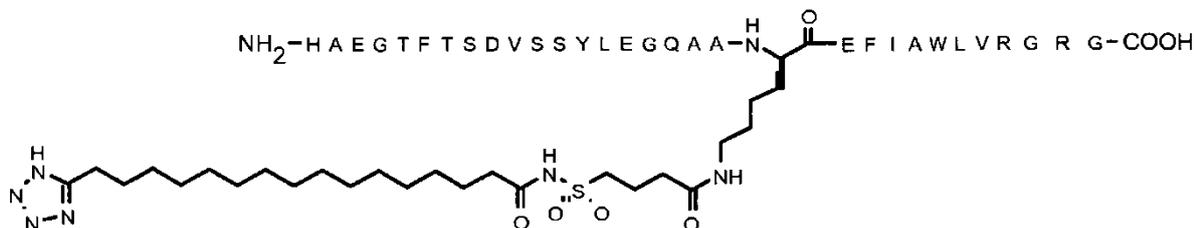
El compuesto del título se preparó como el Ejemplo 6 a partir de ácido {4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butírico (21 mg; Ejemplo 2) y Gly⁸,Arg^{26,3a}GLP-1(7-37) (25 mg). Se obtuvieron 1,5 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR= 9,05 min (95 %)

CLEM: m/z = 1328 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1328

Ejemplo comparativo 8

N-ε-26-{4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butiril} Arg³⁴GLP-1 (7-37)



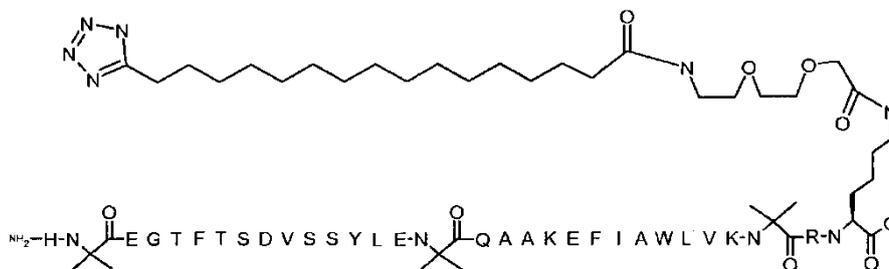
Este compuesto se preparó como el Ejemplo 5 a partir de ácido {4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butírico (21 mg; Ejemplo 2) y péptido Arg³⁴GLP-1(7-37) (0,3 g, 30 % puro). Se obtuvieron 10,1 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR= 9,35 min (94 %)

CLEM: m/z = 1281 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1281

20 Ejemplo comparativo 9

N-ε-37-(2-(2-(2-(16-(tetrazol-5-il)(hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetil)) Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1 (7-37)



Preparado como se describe en el "Procedimiento típico".

HPLC: (procedimiento B6): TR = 31,8 min (98 %), (procedimiento A1): TR = 41,5 min

CLEM: m/z = 988,7 (MH₄⁴⁺), 1317,8 (MH₃³⁺). Calculado (MH)⁺: 3949,6

Ejemplo comparativo 10

Se disolvió hormona del crecimiento humana (100 mg, hGH) en H₂O (6 ml), DIEA (7,5 µl) y NMP (6 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió 16-(tetrazol-5-il)hexadecanoil-ONSu (3,5 mg, 2 equiv.), disuelto en NMP (100 µl). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se purificó por cromatografía de intercambio iónico.

Purificación de hGH monoacilada en posición 140 o 145.

- 5 La mezcla de reacción en bruto se diluyó cinco veces en Tris 50 mM pH 8,5 y se aplicó a una columna Mono Q. Para la purificación de 6 ml de mezcla de reacción en bruto se usó una columna 10/10 Mono Q de 10 ml de Amersham Pharmacia. Se usó un gradiente de 1000 VC para separar la hGH nativa, monoacilada en la posición 30/45/70, monoacilada en la posición 140/145, diacilada y triacilada. Poco después de la elución de la hGH triacilada, se usó un gradiente abrupto para eluir hGH dimérica. Como tampón de elución se usó Tris 50 mM, NaCl 2 M, pH 8,5. La purificación se realizó a 4 °C.

Después de la elución, se combinaron las fracciones que contenían hGH monoacilada (pico 2) y posteriormente se ultrafiltraron usando un Amicon con un filtro YM10. El tampón de lavado fue carbonato de amonio 50 mM pH 8,0. Después de la ultrafiltración, se liofilizó la proteína acilada.

- 15 Los cromatogramas que representan A280 nm y A254 nm mostraron ambos cinco distintos picos que se caracterizaron por mapeo peptídico:

El pico 1 contiene hGH nativa

El pico 2 contiene hGH monoacilada en la posición 38 o 45 o 70.

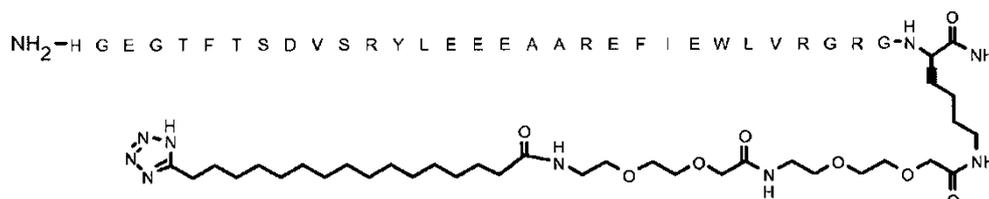
El pico 3 contiene hGH monoacilada en la posición 140 o 145

El pico 4 contiene hGH diacilada

- 20 El pico 5 contiene hGH triacilada

Ejemplo comparativo 11

[2-(2-[[2-(2-carbamoilmetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etil]amida)-NH₂ del ácido Gly⁸,Glu^{22,23,30}Arg^{18,26,34} GLP-1 (7-37)Lys(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico



- 25 Preparado como se describe en el "Procedimiento típico".

HPLC: (procedimiento B6): TR = 30,283 min (96 %)

CLEM: m/z = 1441,8 (MH₃)³⁺. Calculado (MH₃)³⁺: 1439,6

Ejemplo comparativo 12

Gly⁸Arg^{26,34}GLP-1 (7-37)Lys(4-(4-(4-(4-(5-tetrazolil)fenil)fenil)fenoxi)butirilo)



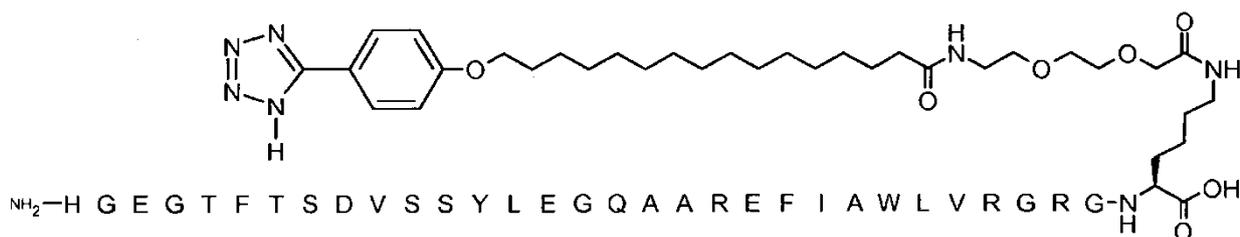
- 30

Preparado como se describe en el "Procedimiento típico".

HPLC: (procedimiento B4): TR= 10,89 min (100 %)

CLEM: m/z = 1304 (MH₃)³⁺. Calculado (MH₃)³⁺: 1304

- 35 **Péptido N-^ε38-(2-(2-(2-(16-(4-(5-tetrazolil)fenoxi)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil) [Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁸1GLP-1(7-37)**

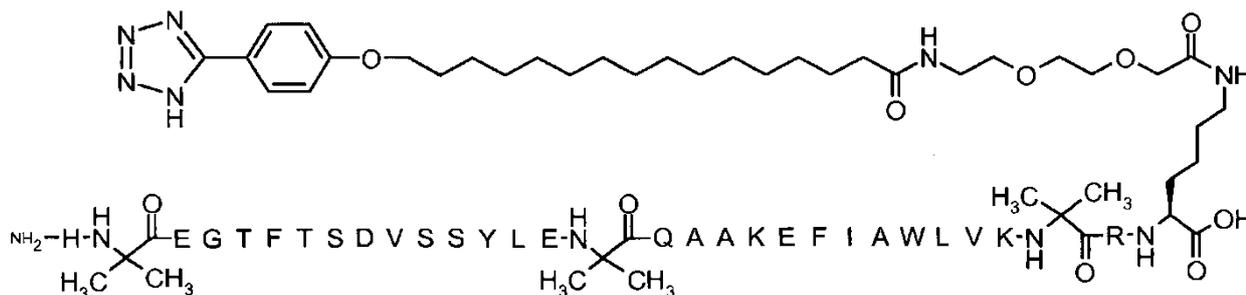


El péptido [Gly8,Arg26,34,Lys38] GLP-1-(7-37) se preparó en un sintetizador de péptidos Advanced Chemtech APEX 348 usando metodología convencional de Fmoc y usando resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,400 g, carga: 1,4 mmol/g) como resina de partida. Lys38 se protegió como Fmoc-Lys(ivDde)-OH.

- 5 Se eliminó IvDde con hidrazina al 3 % y piperidina al 3 % en NMP durante 60 min. El compuesto del título se preparó por acilación con N-Fmoc ácido (2-(2-aminoetoxi)etoxi)acético (0,56 mmol), seguido de eliminación del grupo Fmoc y acilación con 0,62 mmol de ácido 16-(4-(5-tetrazolil)fenoxi)hexadecanoico. Después de escisión del soporte, el péptido se purificó por HPLC preparativa (elución en gradiente 0-5 min = 30 % de MeCN, 5-40 min = 30-65 % de MeCN; Xterra prep. Ms C18). TR = 26,1 min
- 10 Maldi: m/z = 4071; Calculado: 4069,6

Ejemplo comparativo 13

epsilon37N-eeepsilon37-(2-(2-(2-(16-(4-(5-Tetrazolil)fenoxi)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil)[Aib8,22,35,Lys37]GLP-1 (7-37)



- 15 El péptido [Aib 8,22,35,Lys37] GLP-1(7-37) se preparó en un sintetizador de péptidos Advanced ChemTech APEX 348 usando metodología convencional de Fmoc y usando resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,400 g, carga: 1,4 mmol/g) como resina de partida. Lys37 se protegió como Fmoc-Lys(ivDde)-OH.

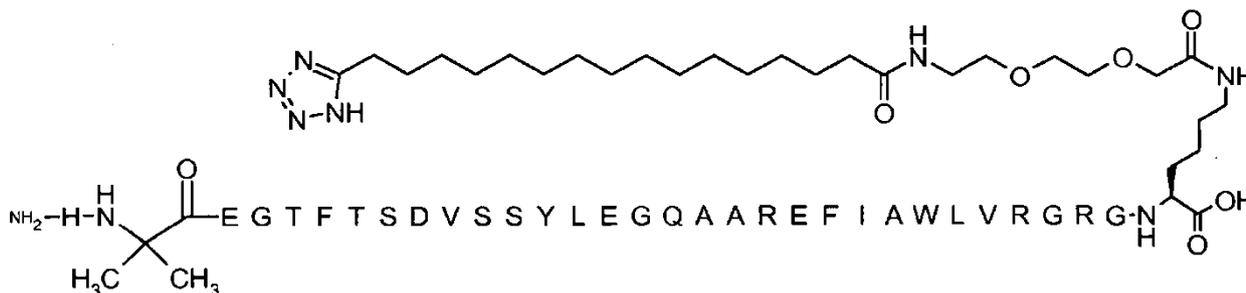
- 20 Se eliminó IvDde con hidrazina al 3 % y piperidina al 3 % en NMP durante 60 min. Después de esta desprotección, el péptido unido a la resina se aciló con N-Fmoc ácido (2-(2-aminoetoxi)etoxi)acético (0,59 mmol), seguido de eliminación del grupo Fmoc y acilación con 0,62 mmol de ácido 16-(4-(5-tetrazolil)fenoxi)hexadecanoico. El péptido se escindió del soporte (TFA al 90 %, Tis al 5 %, tioanisol al 2 %, agua al 3 %, 2 h), se precipitó con Et₂O, se liofilizó y se purificó por HPLC preparativa (elución en gradiente 0-5 min = 30 % de MeCN, 5-40 min = 30-65 % de MeCN; Xterra prep. Ms C18).

TR = 26,85 min

- 25 Maldi: m/z = 4042. Calculado: 4040,7

Ejemplo comparativo 14

Péptido N^{ε38}-(2-(2-(2-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil)etoxi)etoxi)acetil) [Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1 (7-37)



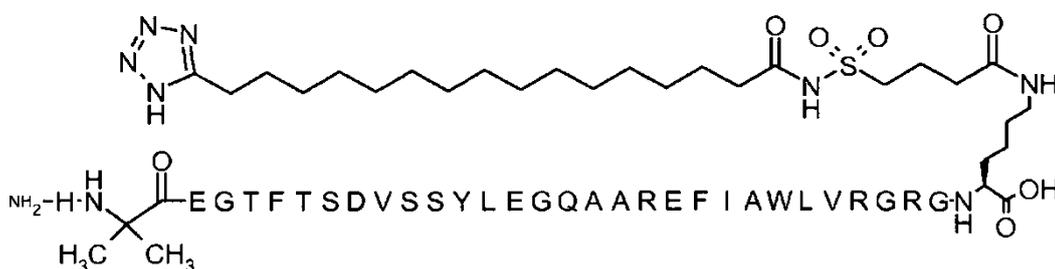
El péptido [Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1 (7-37) se preparó en el sintetizador de péptidos Advanced ChemTech APEX 348 usando metodología convencional de Fmoc y resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,150 g, carga: 1,4 mmol/g) como resina de partida. Lys38 se protegió como Fmoc-Lys(ivDde)-OH.

5 Se eliminó IvDde con hidrazina al 3 % y piperidina al 3 % en NMP durante 60 min. Después de esta desprotección, el péptido unido a la resina se aciló con N-Fmoc ácido (2-(2-aminoetoxi)etoxi)acético (0,35 mmol), seguido de eliminación del grupo Fmoc y acilación con 0,32 mmol de ácido 16-(5-tetrazolil)hexadecanoico. El péptido se escindió del soporte (TFA al 90 %, Tis al 5 %, tioanisol al 2 %, agua al 3 %, 2 h), se precipitó con Et₂O, se liofilizó y se purificó por HPLC preparativa (elución en gradiente 0-5 min: 80 % de A, 20 % de B; 5-45 min hasta 40 % de A, 60 % de B; A: agua + TFA al 0,1 %; B: MeCN + TFA al 0,07 %).

10 CLEM: 4005. Calculado: 4005,6

Ejemplo comparativo 15

Ppéptido N^{ε38}-(4-(N-(16-(tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)butiril)[Aib8,Arg26,34,Lys38]GLP-1(7-37)

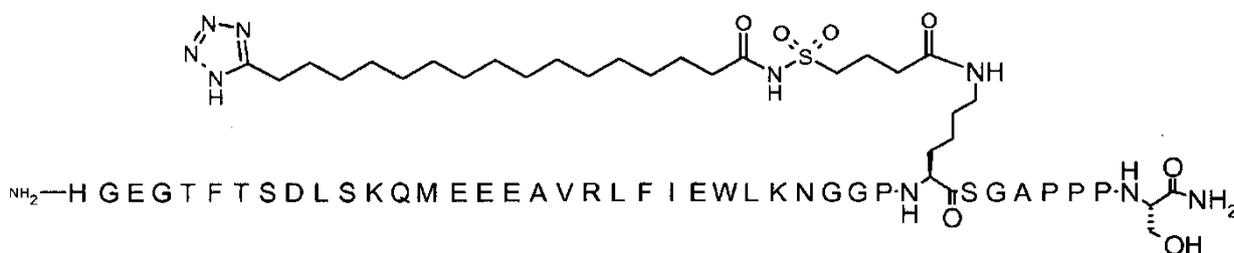


El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6. Se obtuvieron 8 mg del compuesto del título. TR: 32 min.

15 Maldi: m/z = 4007. Calculado: 4009

Ejemplo 16

Ppéptido N-epsilon32-(4-[N-(16-(5-Tetrazolil)hexadecanoil)sulfamoil]butiril)-[Lys32]Exendina[1-39]

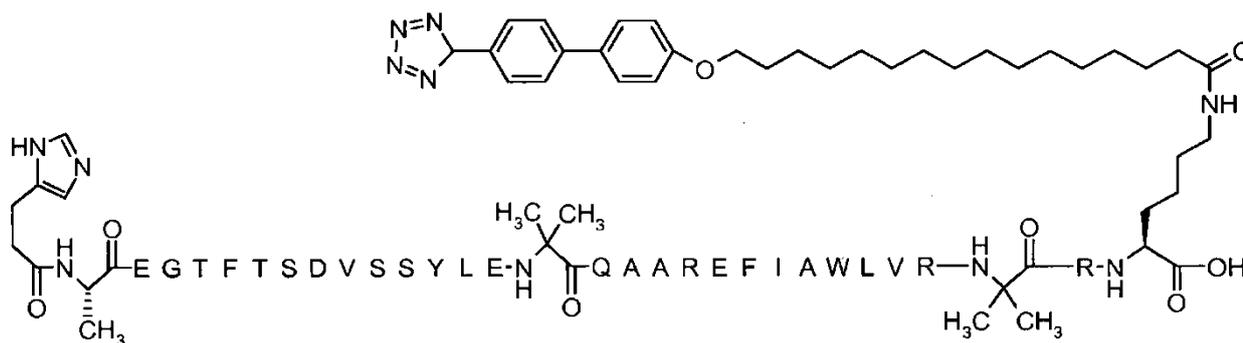


20 El péptido [Lys32]Exendina[1-39] se preparó en el sintetizador de péptidos Advanced ChemTech APEX 348 usando metodología convencional de Fmoc y resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,150 g, carga: 1,4 mmol/g) como resina de partida. Lys38 se protegió como Fmoc-Lys(ivDde)-OH.

25 Se eliminó la protección con IvDde con hidrazina al 3 % y piperidina al 3 % en NMP durante 60 min. Después de esta desprotección, el péptido unido a la resina se aciló con N-Fmoc ácido (2-(2-aminoetoxi)etoxi)acético (0,35 mmol), seguido de eliminación del grupo Fmoc y acilación con 0,32 mmol de ácido 4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoil)sulfamoilbutírico. El péptido se escindió del soporte (TFA al 90 %, Tis al 5 %, tioanisol al 2 %, agua al 3 %, 2 h), se precipitó con Et₂O, se liofilizó y se purificó por HPLC preparativa (elución en gradiente 0-5 min: 80 % de A, 20 % de B; 5-45 min hasta 40 % de A, 60 % de B; A: agua + TFA al 0,1 %; B: MeCN + TFA al 0,07 %).

Ejemplo comparativo 17

30 **Péptido N-epsilon37-(16-(4'-(Tetrazol-5-il)bifenil)-4-iloxi)hexadecanoil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)**



5 El péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) se preparó en un sintetizador de péptidos 433A usando metodología convencional de Fmoc y usando Fmoc-Lys(Boc)-tritol poliestireno (0,51 g, carga: 0,50 mmol/g) como resina de partida. Después de purificación por HPLC preparativa se obtuvieron 159 mg de péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37).

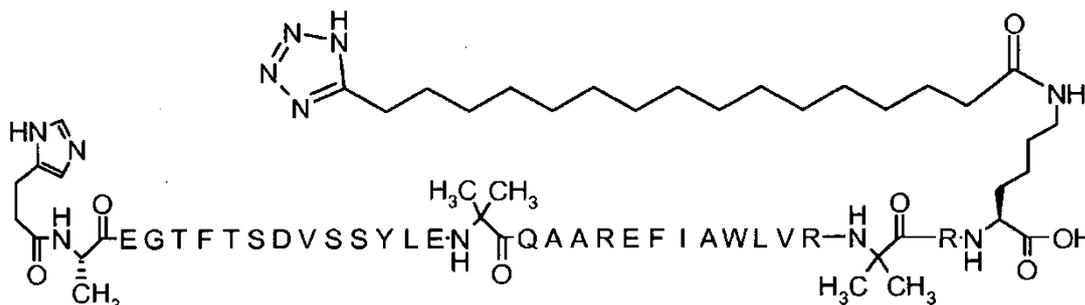
El compuesto del título se preparó por acilación de péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) (18 mg) con ácido 16-(4'-(tetrazol-5-il)bifenil)-4-iloxi)hexadecanoico (10 mg) como se describe para el Ejemplo 5. Se obtuvieron 4,74 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR = 38,4 min (97 %)

10 CLEM: m/z = 1333,7 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1334,2

Ejemplo comparativo 18

N-epsilon37-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



15 El péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 17.

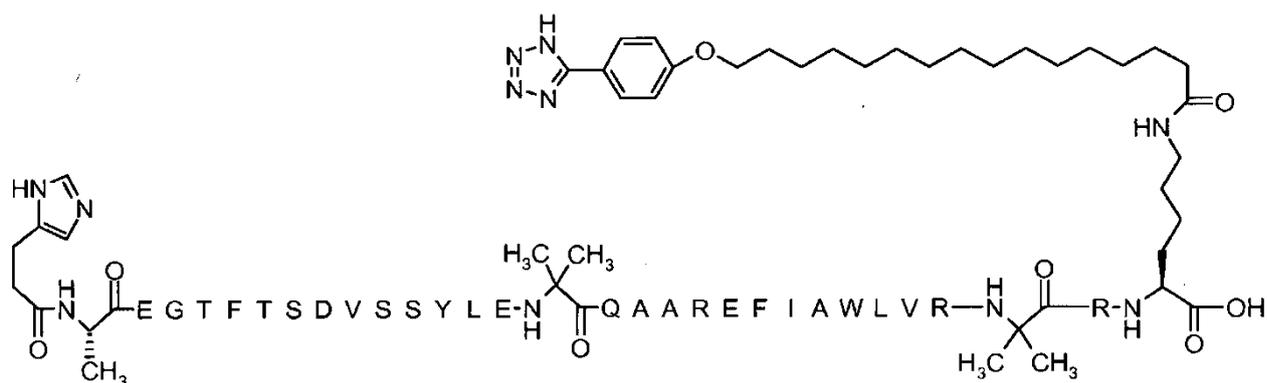
El compuesto del título se preparó por acilación de péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) (18 mg) con ácido 16-(tetrazol-5-il)hexadecanoico(8,5 mg) como se describe para el Ejemplo 5. Se obtuvieron 7,32 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR= 33,0 min (100 %)

20 CLEM: m/z = 1277,9 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1277,8

Ejemplo comparativo 19

N-epsilon37-(16-(4-(tetrazol-5-il)fenoxi)hexadecanoil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



El péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 17.

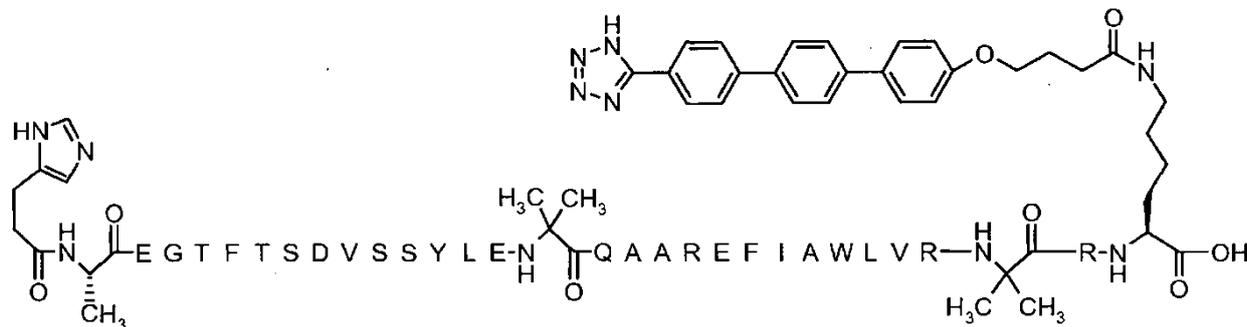
- 5 El compuesto del título se preparó por acilación de péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) (18 mg) con ácido 16-(4-(tetrazol-5-il)fenoxi)hexadecanoico (8,0 mg) como se describe para el Ejemplo 5. Se obtuvieron 2,59 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR = 35,9 min (100 %)

CLEM: m/z = 1309,2 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1308,5

Ejemplo comparativo 20

- 10 **N-epsilon37-(4-(4-(Tetrazol-5-il)[1,1',4',1'']terfenil-4''iloxi)butiroil) [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)**



El péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 17.

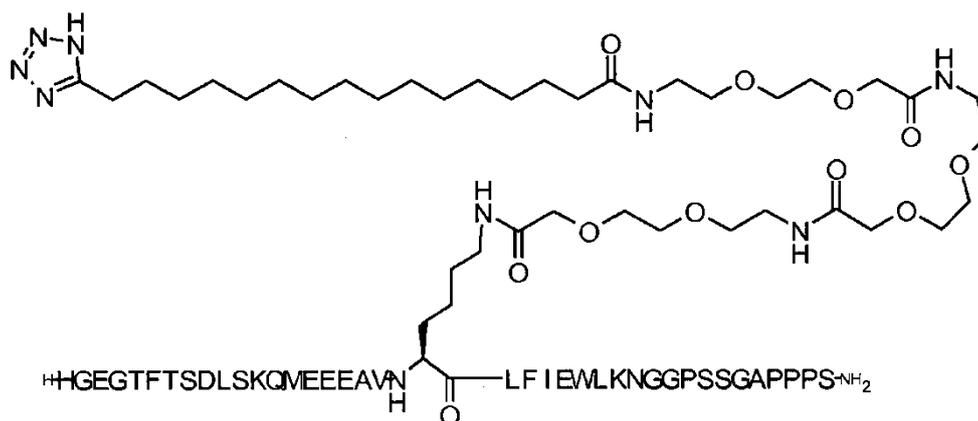
- 15 El compuesto del título se preparó por acilación de péptido [3-(4-imidazolil)propionil7,Aib22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37) (18 mg) con ácido (4-(4-(tetrazol-5-il)[1,1',4',1'']terfenil-4''iloxi)butírico (8,0 mg) como se describe para el Ejemplo 5. Se obtuvieron 0,83 mg del compuesto del título.

HPLC: (procedimiento B6): TR = 31,9 min (100 %)

CLEM: m/z = 1303,3 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1303,1

- 20 **Ejemplo comparativo 21**

N-epsilon37-(2-(2-(2-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoil)amino)etoxi)etoxi)acetil)[Aib8,22,35,Arg26,34,Lys37]GLP-1 (7-37)



5 La unión de cadenas laterales y enlazadores a residuos específicos de lisina sobre el péptido protegido unido a la resina en bruto se realizó en una posición específica por incorporación de Fmoc-Lys(Mtt)-OH durante la síntesis automatizada seguido de desprotección selectiva con un tratamiento por lotes de la resina con péptido protegido con TFA al 1 % y TIS al 1 % en DCM hasta que hubo desaparecido la coloración amarilla (después de 1 h). Esto estuvo seguido por lavado extensivo con DMF, seguido por la unión del espaciador y la cadena lateral como se ha descrito en el Ejemplo 21 y la escisión del péptido de la resina y purificación.

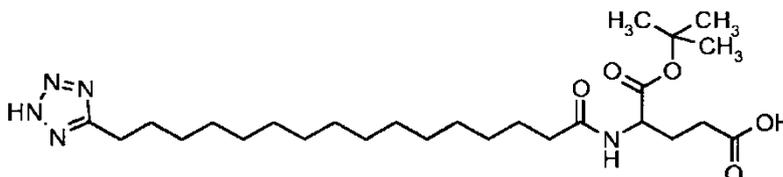
HPLC: (procedimiento B6): TR = 31,1 min (100 %)

CLEM: m/z = 1634,3 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1634,5

10 Ejemplo comparativo 25 (procedimiento general A, acilación usando DesB30 insulina humana)

$\text{N}^{\text{E}29}$ -(16-2H-Tetrazol-5-il-hexadecanoil)gamma-Glu-des(B30) insulina humana

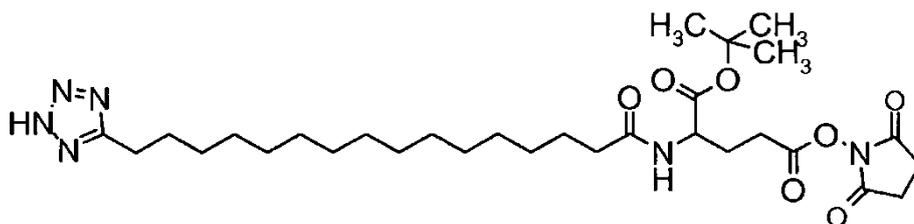
Etapas 1: Síntesis de 1-terc-butil éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico



15 Se calentó ácido 16-(2H-tetrazol-5-il)hexadecanoico (433 mg, 1,34 mmol) en tolueno (5 ml) y 2,2-dimetoxipropano (2 ml, 16 mmol) hasta reflujo durante dos minutos. El disolvente se eliminó al vacío. Se añadió acetato de etilo (10 ml), seguido por clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (359 mg, 1,87 mmol) y 1 hidroxibenzotriazol (281 mg, 2 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadió una mezcla de clorhidrato de alfa *tert*-butil-gamma bencil diéster de ácido L-glutámico (661 mg, 2 mmol), diisopropilamina (0,34 ml, 2 mmol) y acetato de etilo (4 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se distribuyó entre acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se secó la fase orgánica (Na_2SO_4) y se eliminó el disolvente al vacío. El 5-bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico en bruto se purificó en C-18 RP-HPLC 5 cm x 20 cm, flujo 20 ml/min usando un gradiente de acetonitrilo/agua del 60-90 % que contenía TFA al 0,1 %. Se recogieron las fracciones que contenían 5-bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico y se eliminó el disolvente al vacío. El residuo se volvió a disolver en acetato de etilo (10 ml), se añadió paladio sobre carbón activado (200 mg) y la mezcla se agitó en atmósfera de hidrógeno (101325 pascales (1 atm)) durante 3 horas. La mezcla se filtró y se eliminó el disolvente al vacío para proporcionar 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico (100 mg).

HPLC-EM: m/z = 511; R_t = 4,17 min.

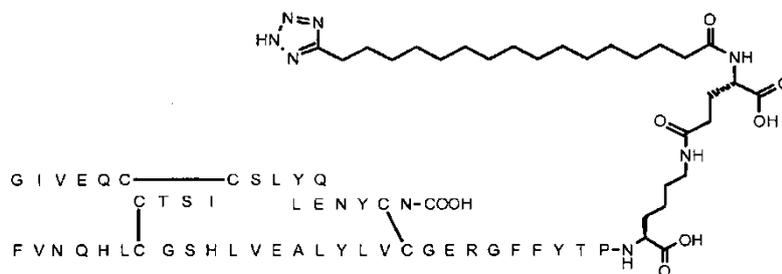
30 **Etapas 2: Síntesis de 1-*tert*-butil éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico .**



Se disolvió 1-terc-butil éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)-pentanodioico (100 mg, 0,19 mmol) en THF (10 ml). La mezcla se enfrió con un baño de hielo. Se añadieron diisopropiletilamina (0,041 ml, 0,24 mmol) y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (71 mg, 0,24 mmol). La mezcla se agitó en nitrógeno a 0 °C. Después de 30 minutos se retiró la refrigeración con hielo y la mezcla se agitó durante 3 horas adicionales. El disolvente se eliminó al vacío seguido por coevaporación de cada residuo con tolueno. El producto en bruto se disolvió en acetato de etilo (30 ml), se lavó con agua (2 X 20 ml) y se extrajeron las fases acuosas combinadas una vez con acetato de etilo (30 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se eliminó el disolvente al vacío para proporcionar el compuesto del título (83 mg), que se usó en la etapa posterior sin purificación adicional.

HPLC-EM: m/z = 607; R_t = 4,73 min.

Etapa 3: Síntesis de N^{B29}-(6-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoil) gamma-Gludes(B30) insulina humana

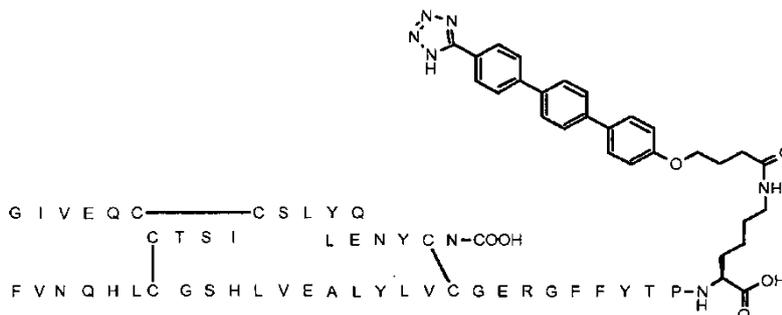


Se disolvió A1 B1 BocBoc des(B30) insulina (Kurtzhals P; Havelund S; Jonassen I; Kiehr B; Larsen UD; Ribel U; Markussen J Biochemical Journal, 1995, 312, 725-731) (0,2 g, 0,034 mmol) en DMSO (3 ml). Se añadieron trietilamina (0,047 ml, 0,34 mmol) y una solución de 1-terc-butil éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster del ácido 2-(16-2H-tetrazol-5-il-hexadecanoilamino)pentanodioico (58 mg, 0,096 mmol) en DMSO (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se enfrió con un baño de hielo (el DMSO se congeló), se añadió agua (10 ml) y se dejó que la mezcla congelada se fundiera. El pH se ajustó hasta 5,2 con HCl 1 N. El producto se dejó precipitar durante 1 hora a 5 °C. El precipitado se aisló por centrifugación y se trató con TFA (10 ml) durante 30 min. Esta solución se vertió en dietiléter enfriado en hielo (40 ml) y el producto en bruto se aisló por centrifugación y se purificó en C-18 RP-HPLC 5 cm X 20 cm, flujo 20 ml/min usando un gradiente de acetonitrilo/agua del 25-45 % que contenía TFA al 0,1 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y liofilizaron. Al material liofilizado se añadió agua (7,2 ml) y el pH se ajustó hasta 8,98 con NaOH 1 N y 0,1 N. El pH se ajustó de nuevo hasta 5,2-5,5 con HCl 0,1 N. El precipitado se aisló por centrifugación y se liofilizó para dar el compuesto del título.

HPLC-EM : m/z = 1536 (m/4), 1229 (m/5), 1024 (m/6); R_t = 3,47 min.

Ejemplo comparativo 26

N^{B29ε}-4-[4''-(1H-Tetrazol-5-il)-[1,1',4',1''']terfenil-4-iloxi]-butiroil des(B30) insulina



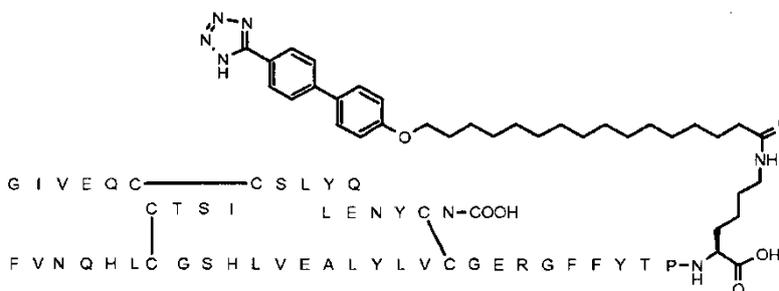
Se suspendió ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1''']terfenil-4-iloxi)butírico (166 mg, 0,42 mmol) en DMF (2 ml) y se trató con TSTU (150 mg, 0,50 mmol) y DIEA (85 μl, 0,50 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y HCl 0,1 M. Se filtró la fase orgánica/suspensión y el

sólido se lavó con éter y se secó al vacío para proporcionar ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico activado, 164 mg. La des(B30) insulina humana (100 mg, 0,018 mmol) se disolvió en Na₂CO₃ 100 mM (1,3 ml, pH 10,2) a temperatura ambiente. El ácido 4-(4-(5-tetrazolil)-[1,1',4',1'']-terfenil-4''-iloxi)butírico activado (10 mg, 0,022 mmol) se disolvió en DMSO (1,3 ml) y se añadió a la solución de insulina. Después de 30 min, se añadió metilamina 0,2 M (0,1 ml). Se ajustó el pH hasta 5,5 con HCl 1 M y se recogió el precipitado isoeléctrico por centrifugación y se secó al vacío. El rendimiento de acoplamiento fue del 75 % (RP-HPLC, columna C4; tampón A: 10 % de MeCN en TFA al 0,1 %-agua, tampón B: 80 % de MeCN en TFA al 0,1 %-agua; gradiente del 20 % al 90 % de B en 16 minutos).

La N^{B29ε}-4-[4''-(1H-tetrazol-5-il)[1,1',4',1'']terfenil-4-iloxi]butiroil des(B30) insulina se purificó por RP-HPLC en columna C4, tampón A: 20 % de EtOH + TFA al 0,1 %, tampón B: 80 % de EtOH + TFA al 0,1 %; gradiente 15-60 % de B, seguido por HPLC en columna C4, tampón A: Tris 10 mM + sulfato de amonio 15 mM en EtOH al 20 %, pH 7,3, tampón B: 80 % de EtOH, gradiente 15-60 % de B. Las fracciones recogidas se desalaron en Sep-Pak con acetonitrilo al 70 % + TFA al 0,1 %, se neutralizaron por la adición de amoníaco y se secaron por congelación. El rendimiento no optimizado fue de 8 mg (7 %). La pureza evaluada por HPLC fue >98 %. CLEM 6088, C₂₇₆H₃₉₄N₆₈O₇₇S₆ requiere 6089.

Ejemplo comparativo 27

N^{B29ε}-16-[4'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-iloxi]-hexadecanoil des(B30) insulina



Se suspendió ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico (309 mg, 0,63 mmol) en DMF (4 ml) y se trató con TSTU (227 mg, 0,75 mmol) y DIEA (127 μl, 0,75 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y HCl 0,1 M. Se filtró la fase orgánica/suspensión y el sólido se lavó con éter y se secó al vacío para proporcionar ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico activado, 290 mg. La des(B30) insulina humana (100 mg, 0,018 mmol) se disolvió en Na₂CO₃ 100 mM (1,3 ml, pH 10,2) a temperatura ambiente. El ácido 16-(4'-(5-tetrazolil)bifenil-4-iloxi)hexadecanoico activado (12 mg, 0,022 mmol) se disolvió en DMSO (1,3 ml) y se añadió a la solución de insulina. Después de 30 min, se añadió metilamina 0,2 M (0,1 ml). Se ajustó el pH hasta 5,5 con HCl 1 M y se recogió el precipitado isoeléctrico por centrifugación y se secó al vacío. El rendimiento de acoplamiento fue del 37 % (RP-HPLC, columna C4; tampón A: 10 % de MeCN en TFA al 0,1 %-agua, tampón B: 80 % de MeCN en TFA al 0,1 %-agua; gradiente del 20 % al 90 % de B en 16 minutos).

La N^{B29ε}-16-[4'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-iloxi]hexadecanoil des(B30) insulina se purificó por RP-HPLC en columna C4, tampón A: 20 % de EtOH + TFA al 0,1 %, tampón B: 80 % de EtOH + TFA al 0,1 %; gradiente 15-60 % de B, seguido por HPLC en columna C4, tampón A: Tris 10 mM + sulfato de amonio 15 mM en EtOH al 20 %, pH 7,3, tampón B: 80 % de EtOH, gradiente 15-60 % de B. Las fracciones recogidas se desalaron en Sep-Pak con acetonitrilo al 70 % + TFA al 0,1 %, se neutralizaron por la adición de amoníaco y se secaron por congelación. El rendimiento no optimizado fue de 5 mg (7 %). La pureza evaluada por HPLC fue >98 %. CLEM 6180, C₂₈₂H₄₁₄N₆₈O₇₇S₆ requiere 6181.

HPLC-procedimiento B4:

A: acetonitrilo

B: agua

D TFA al 1,0 % en agua

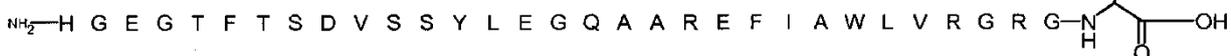
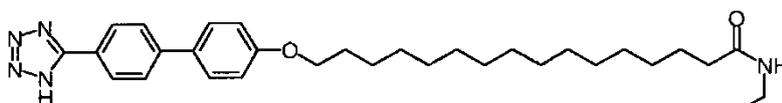
Gradiente: 5 --> 95 % A, 15 min, 1,0 ml/min

columna Symmetry 300, C18, 5 μm, 3,9 x 150 mm

Temperatura de horno de columna = 42 °C; detección a 214 nm.

Ejemplo comparativo 28

Péptido N^{ε37}-16-(4-(4-(5-Tetrazolil)fenil)feniloxi)hexadecanoil-[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 16-(4-(4-(5-tetrazolil)fenil)fenil)feniloxi)hexadecanoico y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (25 mg). Se obtuvieron 6,1 mg del producto del título.

5 HPLC (procedimiento B4): TR = 13,07 min (94 %)

CLEM: m/z = 1335 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1334

Ejemplo comparativo 29

Péptido N⁶³⁷-(4-(4-(4-(4-(5-Tetrazolil)fenil)fenil)fenil)fenoxi)butiril)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



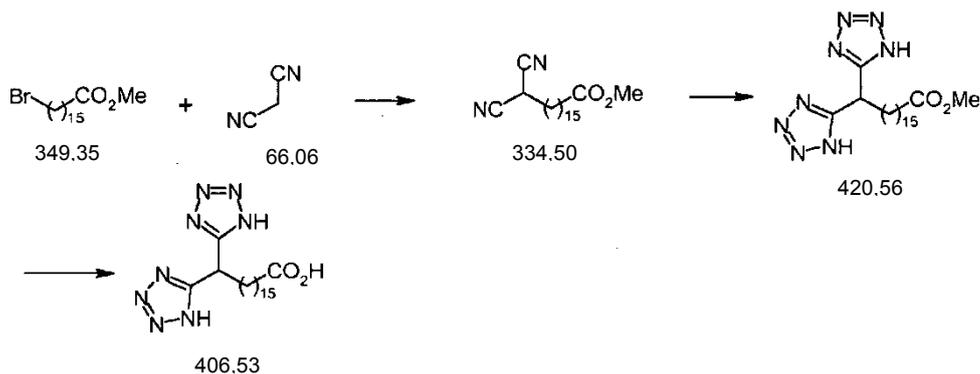
10 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 4-(4-(4-(4-(5-tetrazolil)fenil)fenil)fenil)fenoxi)butírico y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (30 mg). Se obtuvieron 3,8 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 10,84 min (86 %)

CLEM: m/z = 1303 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1303

Ejemplo 30

15 **Ácido 17,17-bis(5-tetrazolil)heptadecanoico**



Éster metílico del ácido 17,17-dicianoheptadecanoico:

20 A éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico (1,40 g, 4,0 mmol) en MeCN (20 ml) se añadieron malonodinitrilo (1,01 g, 15,3 mmol) y K₂CO₃ (0,92 g, 6,64 mmol). La mezcla se agitó a 80 °C durante 18,5 h. Se añadieron agua (50 ml) y HCl 1 N (50 ml) y el producto se extrajo con AcOEt. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. Se obtuvieron 1,87 g (100 %) de un aceite que cristalizó completamente después de algunas horas.

RMN de ¹ (DMSO-d₆): δ 1,24 (m, 22H), 1,36-1,55 (m, 4H), 1,96 (m, 2H), 2,28 (t, J = 7 Hz, 2H), 3,57 (s, 3H), 4,80 (t, J = 7 Hz, 1 H).

25 **Éster metílico del ácido 17,17-bis(5-tetrazolil)heptadecanoico:**

A éster metílico del ácido 17,17-dicianoheptadecanoico (2,25 g, 6,73 mmol) se añadieron DMF (12 ml), AcOH (4,1

ml, 68,3 mmol), NEt_3 (9,0 ml, 64,9 mmol) y NaN_3 (5,25 g, 80,8 mmol). La mezcla resultante se agitó a 140 °C durante 19 h. Se añadieron agua (90 ml) y HCl 1 N (60 ml) y la mezcla se acidificó mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado. El sólido se retiró por filtración, se lavó con agua y se recrystalizó en metanol caliente, para proporcionar 1,70 g (60 %) del compuesto del título en forma de un sólido.

- 5 RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 1,21 (s a, 24H), 1,51 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,28 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,57 (s, 3H), 4,94 (t, $J = 7$ Hz, 1 H).

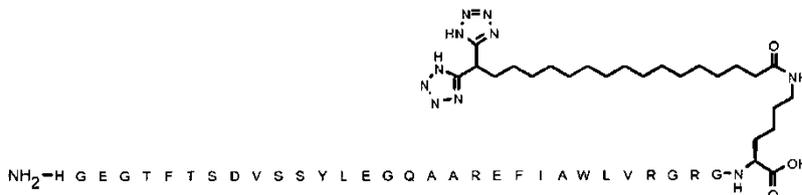
Ácido 17,17-bis(5-tetrazolil)heptadecanoico

10 Se disolvió éster metílico del ácido 17,17-bis(5-tetrazolil)heptadecanoico (1,70 g, 4,04 mmol) en MeOH (40 ml) y se añadió una solución de NaOH (1,17 g, 29 mmol) en agua (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 19 h no pudo detectarse más éster de partida por RMN de ^1H y la mezcla se diluyó con una mezcla de agua (130 ml) y HCl 1 N (50 ml). El producto se aisló por filtración, se lavó con agua y se recrystalizó en MeCN en ebullición (40 ml), para proporcionar 0,53 g (32 %) del compuesto del título en forma de un sólido. Podría obtenerse más producto (0,39 g) de las aguas madre. Rendimiento total: 0,92 g, 56 %.

RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 1,21 (m, 24H), 1,48 (m, 2H), 2,18 (m, 4H), 4,94 (t, $J = 7$ Hz, 1H).

15 **Ejemplo comparativo 31**

Péptido $\text{N}^{\text{E}37}$ -(17,17-Bis(5-tetrazolil)heptadecanoil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)

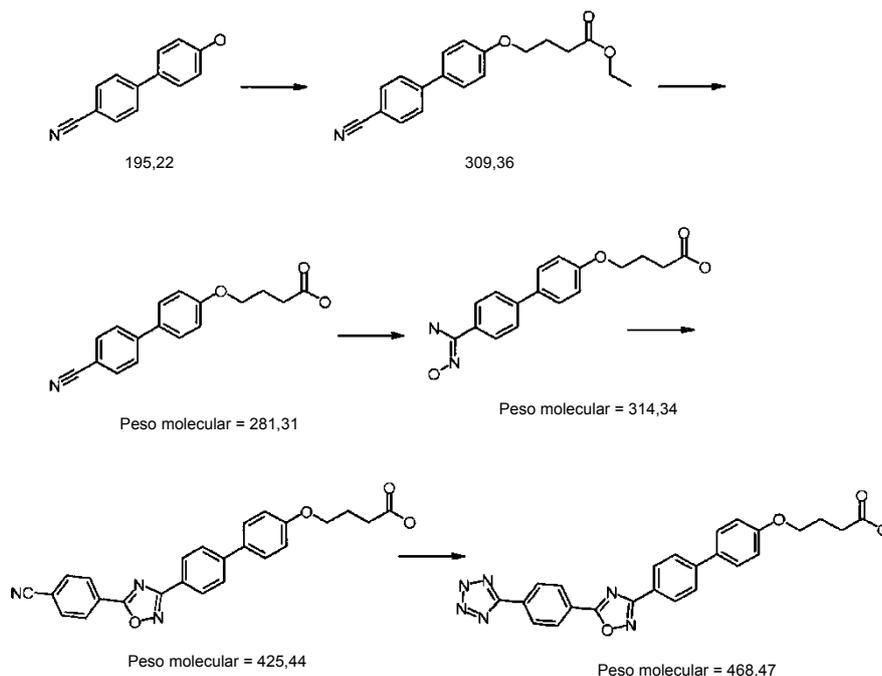


20 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 17,17-bis(5-tetrazolil)heptadecanoico y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (45 mg). Se obtuvieron 12,5 mg del producto del título. HPLC (procedimiento B4): TR = 11,37 min (91 %)

CLEM: $m/z = 1306$ (MH_3^{3+}), 1959 (MH_2^{2+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1306

Ejemplo 32

Ácido 4-(4'-{5-[4-(5-tetrazolil)fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il}bifenil-4-iloxi)butírico



25 Una mezcla de 4'-ciano-4-hidroxibifenilo (4,0 g, 20,5 mmol), MeCN (30 ml), 4-bromobutirato de etilo (3,75 ml, 5,11 g, 26,2 mmol) y K_2CO_3 (3,86 g, 27,9 mmol) se agitó a 85 °C. Después de 20 h se añadió agua (150 ml) y se extrajo el

producto con AcOEt. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron, para proporcionar 6,91 g (100 %) de éster etílico del ácido 4-(4'-cianobifenil-4-iloxi)butírico en forma de un aceite.

5 A una solución de éster etílico del ácido of 4-(4'-cianobifenil-4-iloxi)butírico (3,78 g, 12,7 mmol) en THF (50 ml) se añadió una solución de NaOH (1,0 g, 25 mmol) en agua (1,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h y después a 67 °C durante 3 h. Se añadió más NaOH (1 g) en agua (1 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 15 h. Se añadió MeOH (10 ml) y después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 h la mezcla se diluyó con agua (150 ml) y se acidificó con HCl acuoso concentrado (6,6 ml). El producto se aisló por filtración y se lavó con agua (aprox. 20 ml). El sólido se suspendió en MeCN (50 ml), se calentó hasta reflujo (sin disolución) y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La filtración y el secado a presión reducida proporcionaron 10 2,70 g (76 %) de ácido 4-(4'-cianobifenil-4-iloxi)butírico en forma de un sólido incoloro.

Una mezcla de ácido 4-(4'-cianobifenil-4-iloxi)butírico (2,70 g, 9,60 mmol), EtOH (10 ml), THF (15 ml), K_2CO_3 (3,35 g, 24,2 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (1,50 g, 21,6 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 d y después a 80 °C durante 24 h. Se añadieron agua (100 ml) y HCl 1 N (50 ml) y el producto se aisló por filtración y se lavó con agua. El sólido se suspendió en MeCN (70 ml), se calentó hasta reflujo, se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche, se retiró por filtración y se secó a presión reducida para proporcionar 3,23 g (100 %) 15 de ácido 4-(4'-(*N*-hidroxicarbamimidoil)bifenil-4-iloxi)butírico.

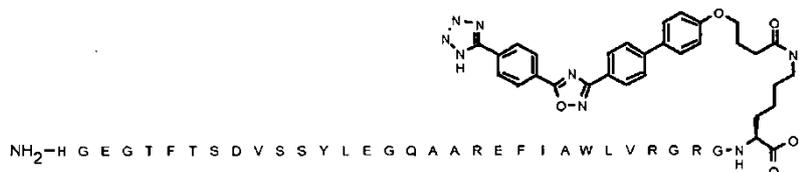
Se añadió una solución de cloruro de 4-cianobenzoilo (2,29 g, 13,8 mmol) en dioxano (10 ml) a una suspensión de ácido 4-(4'-(*N*-hidroxicarbamimidoil)bifenil-4-iloxi)butírico (3,23 g, 9,6 mmol) en dioxano (50 ml) y piridina (2,5 ml, 31,6 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y después se calentó hasta 100 °C durante 22 h. La mezcla se concentró hasta 1/2 de su volumen original, se diluyó con agua (100 ml) y se acidificó mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado (3 ml). El producto se aisló por filtración y se lavó con agua (50 ml). El sólido se suspendió en MeCN (70 ml), se calentó hasta reflujo, se dejó enfriar, se retiró por filtración y se secó a presión reducida para proporcionar 3,17 g (54 %) de ácido 4-(4'-[5-[4-cianofenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il]bifenil-4-iloxi)butírico en forma de un sólido. 25

Una mezcla de ácido 4-(4'-[5-[4-cianofenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il]bifenil-4-iloxi)butírico (3,17 g, 7,45 mmol), DMF (15 ml), AcOH (2,25 ml, 37,5 mmol), NEt_3 (5,0 ml, 36 mmol) y NaN_3 (2,89 g, 44,5 mmol) se agitó a 140 °C. Después de 24 h se añadieron agua (150 ml) y ácido clorhídrico concentrado (6 ml). El producto se aisló por filtración, se lavó con agua, se resuspendió en MeCN (100 ml), se calentó hasta reflujo (no se disolvió completamente), se homogeneizó y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La filtración proporcionó 2,50 g (72 %) de ácido 4-(4'-[5-[4-(5-tetrazolil)fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il]bifenil-4-iloxi)butírico en forma de un sólido. 30

RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 1,98 (m, 2H), 2,41 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 4,06 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 7,07 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,72 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,88 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8,16 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8,32 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8,41 (d, $J = 8$ Hz, 2H).

Ejemplo comparativo 33

35 **Péptido** $\text{N}^{\text{e}37}$ -(4-(4'-[5-[4-(5-Tetrazolil)fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il]bifenil-4-iloxi)butiril)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



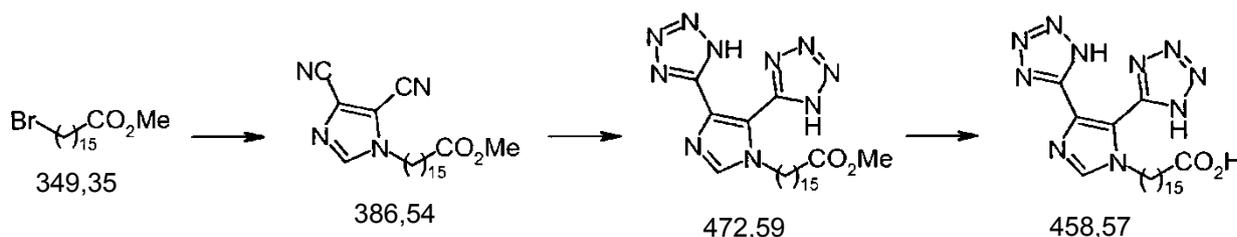
El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 4-(4'-[5-[4-(5-tetrazolil)fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il]bifenil-4-iloxi)butírico y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (60 mg). Se obtuvieron 1,8 mg del producto del título.

40 HPLC (procedimiento B4): TR = 11,26 min (99 %)

CLEM: $m/z = 1326$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1326

Ejemplo 34

Ácido 16-(4,5-bis(5-tetrazolil)imidazol-1-il)hexadecanoico



Una mezcla de éster metílico del ácido 16-bromohexadecanoico (3,50 g, 10,02 mmol), 4,5-dicianoimidazol (1,52 g, 12,87 mmol), MeCN (30 ml) y K_2CO_3 (1,95 g, 14,1 mmol) se agitó a 80 °C durante 66 h.

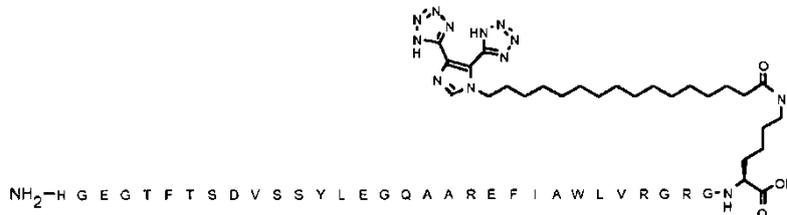
5 Se añadieron agua (100 ml) y HCl 1 N (40 ml) y el producto se extrajo dos veces con AcOEt. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron a presión reducida. La recrystalización en MeOH (10 ml) proporcionó 3,41 g (88 %) de éster metílico del ácido 16-(4,5-dicianoimidazol-1-il)hexadecanoico en forma de un sólido incoloro.

10 Una mezcla de éster metílico del ácido 16-(4,5-dicianoimidazol-1-il)hexadecanoico (3,86 g, 10 mmol), DMF (8 ml), AcOH (6,2 ml, 103 mmol), NEt_3 (13,8 ml, 100 mmol) y NaN_3 (7,98 g, 123 mmol) se agitó a 140 °C. Se añadió más DMF (9 ml) después de 20 h. Después de 44 h se añadió agua (100 ml), seguido por acidificación con ácido clorhídrico concentrado (aprox. 12 ml). El producto se retiró por filtración, se lavó con agua, se resuspendió en MeCN (100 ml), se calentó hasta reflujo (sin disolución completa) y se dejó enfriar. La filtración y el secado a presión reducida proporcionaron 4,57 g (97 %) de ácido 16-(4,5-bis(5-tetrazolil)imidazol-1-il)hexadecanoico en forma de un sólido marrón. Este sólido (4,57 g, 9,67 mmol) se mezcló con MeOH (50 ml) y una solución de NaOH (4,01 g, 100 mmol) en agua (10 ml). La solución transparente resultante se agitó a 60 °C durante 22 h y se vertió en una mezcla agitada de agua (400 ml) y ácido clorhídrico concentrado (12 M, 20 ml). El sólido se retiró por filtración, se lavó con agua, se resuspendió en MeCN (150 ml), se calentó hasta reflujo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La filtración y el secado a presión reducida proporcionaron 3,71 g (84 %) del ácido del título en forma de un sólido marrón.

20 RMN de 1H (DMSO- d_6): δ 1,20 (m, 22H), 1,48 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 2,19 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 4,24 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 8,38 (s, 1 H).

Ejemplo comparativo 35

Péptido N^{ε37}(16-(4,5-bis(5-tetrazolil)imidazol-1-il)hexadecanoil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)



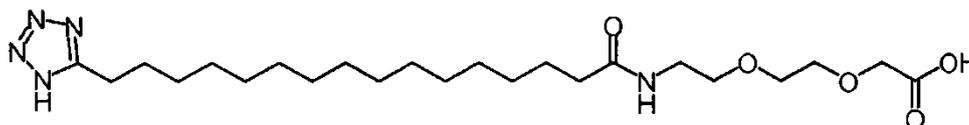
25 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 16-(4,5-bis(5-tetrazolil)imidazol-1-il)hexadecanoico y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (60 mg). Se obtuvieron 8 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 11,61 min (98 %)

CLEM: $m/z = 1323$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1323

Ejemplo xxx.

30 Ácido (2-(2-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acético



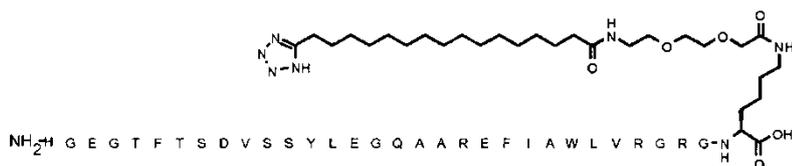
35 A una suspensión de resina de cloruro de 2-clorotritilo (2 g; poliestireno reticulado) en diclorometano se añadieron una solución de ácido (2-(2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)etoxi)etoxi)acético (0,55 g, 1,43 mmol) en diclorometano (15 ml) y después una solución de DIPEA (0,65 ml) en diclorometano (7 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 min se añadió metanol (2 ml) y se continuó la agitación durante 10 min. La resina se filtró, se lavó dos veces con diclorometano y una vez con DMF. La resina se trató con una solución al 20 % de piperidina en DMF (2 X 10 min) y se lavó extensivamente con DMF y diclorometano. Se añadió una solución de

ácido 16-(5-tetrazolil)hexadecanoico (1,0 g, 3,08 mmol), 3-hidroxi-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazin-4-ona (0,49 g, 3,0 mmol) y EDC (0,58 g, 3,03 mmol) en diclorometano (25 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 60 h. La resina después se lavó extensivamente con DMF, diclorometano y metanol y se suspendió en una mezcla de ácido trifluoroacético y diclorometano (25:75; vol). Después de 0,5 h se filtró la resina, se aclaró con diclorometano, se concentraron los filtrados combinados y se recristalizó el residuo en MeCN para proporcionar 0,26 g del compuesto del título.

RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 1,23 (m, 22H), 1,46 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 2,04 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2,85 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,51 (m, 2H), 3,58 (m, 2H), 4,01 (s, 2H).

Ejemplo comparativo 36

10 **Péptido N $^{\epsilon 37}$ -((2-(2-(16-(5-Tetrazolil)hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetil)[Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37)**



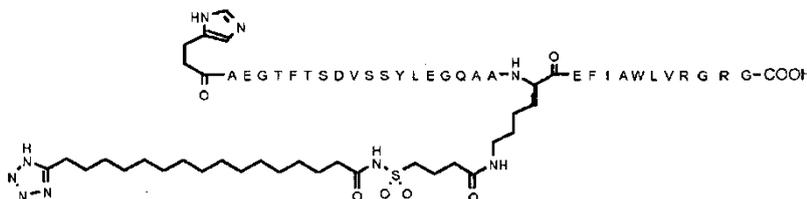
El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido (2-(2-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acético y péptido [Gly8,Arg26,34]GLP-1-(7-37) (85 mg). Se obtuvieron 28 mg del producto del título.

15 HPLC (procedimiento B4): TR = 11,35 min (95 %)

CLEM: $m/z = 1327$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1327

Ejemplo comparativo 37

Péptido N $^{\epsilon 26}$ -(4-{16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil}butiril)[(3-(4-imidazolil)propionil7,Arg34]GLP-1-(7-37)



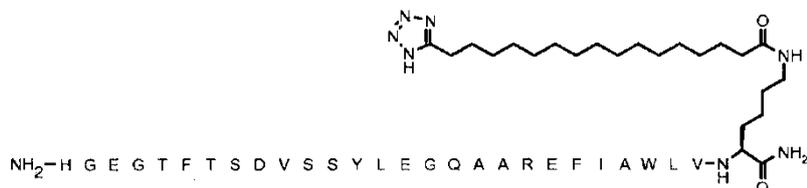
20 Este compuesto se preparó como el ejemplo 5 a partir de ácido 4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butírico y péptido [(3-(4-imidazolil)propionil7,Arg34]GLP-1-(7-37) (50 mg). Se obtuvieron 13,3 mg del compuesto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 11,61 min (98 %)

CLEM: $m/z = 1276$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1276

Ejemplo comparativo 38

25 **Peptidoamida N $^{\epsilon 34}$ -(16-{tetrazol-5-il}hexadecanoil)-[Gly8, Arg26] GLP-1 (7-34)**



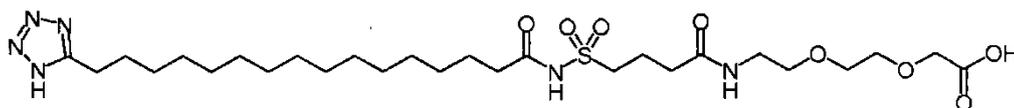
El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 16-(5-tetrazolil)hexadecanoico y peptidoamida [Gly8, Arg26] GLP-1 (7-34) (50 mg). Se obtuvieron 17 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 12,53 min (100 %)

30 CLEM: $m/z = 1136$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1136

Ejemplo 39

Ácido (2-(2-(4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butirilamino)etoxi)etoxi)acético

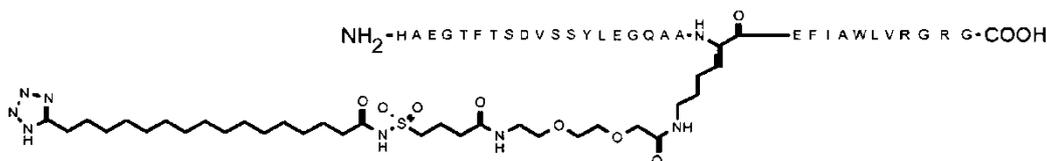


Este compuesto se preparó sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo como se describe para la síntesis de ácido (2-(2-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acético.

5 RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 1,23 (m, 22H), 1,49 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,23 (m, 4H), 2,85 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,35 (m, 4H), 3,52 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 4,01 (s, 2H), 7,91 (t a, $J = 6$ Hz, 1 H), 11,55 (s a, 1 H).

Ejemplo 40

Péptido N^{ε26}-{(2-[2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butirilamino)etoxi]etoxi)acetil)-[Arg34] GLP-1 (7-37)}



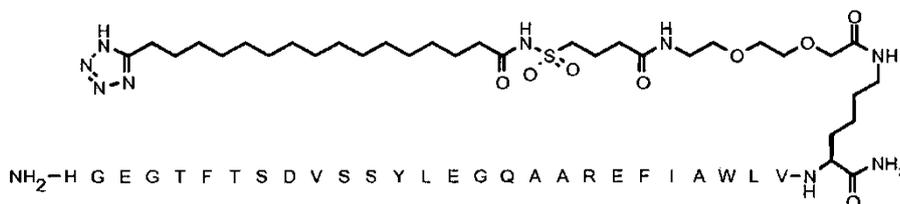
10 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido (2-(2-(4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butirilamino)etoxi)etoxi)acético y péptido [Arg34]GLP-1-(7-37) (350 mg). Se obtuvieron 35 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 11,63 min (99 %)

CLEM: $m/z = 1329$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1329

15 Ejemplo comparativo 41

Peptidoamida N^{ε34}-{(2-[2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butirilamino)etoxi]etoxi)acetil)-[Arg26] GLP-1 (7-34)}



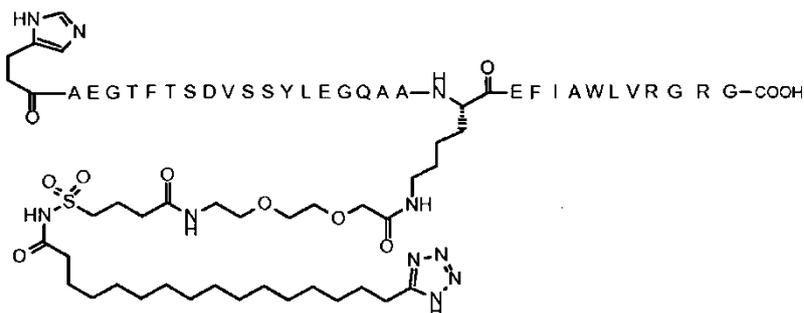
20 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido (2-(2-(4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butirilamino)etoxi)etoxi)acético y péptido [Arg26]GLP-1-(7-34) (40 mg). Se obtuvieron 6,5 mg del producto del título.

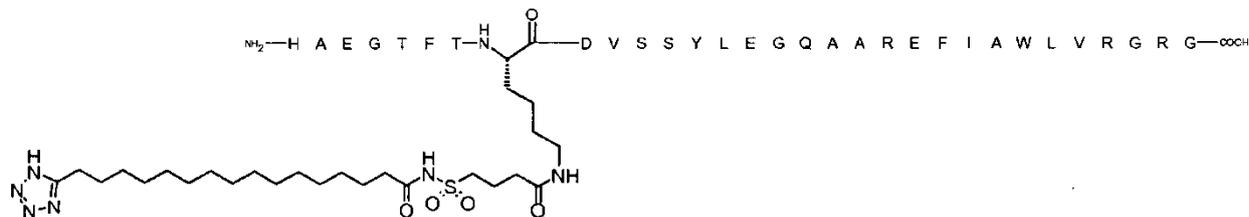
HPLC (procedimiento B4): TR = 12,44 min (100 %)

CLEM: $m/z = 1234$ (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1234

Ejemplo comparativo 42

25 **Péptido N^{ε26}-{(2-[2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butirilamino)etoxi]etoxi)acetil)-[(3-(4-imidazolil)propionil)7,Arg34]GLP-1 (7-37)}**



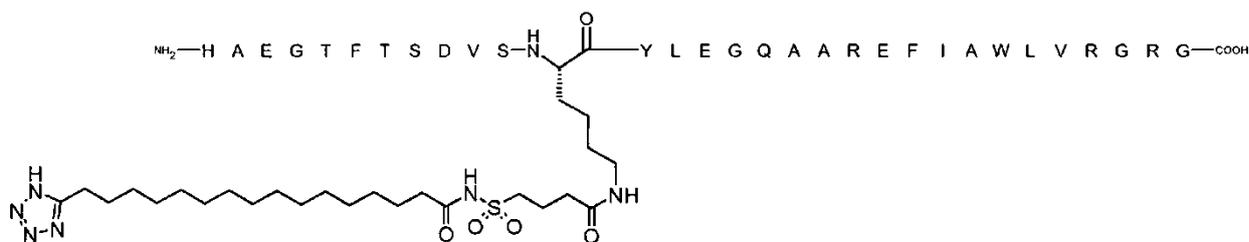
Péptido N^{ε14}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys14;Arg26,34]GLP-1-(7-37)

5 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butírico y péptido [Lys14;Arg26,34]GLP-1-(7-37) (65 mg). Se obtuvieron 19 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 11,54 min (98 %)

CLEM: m/z = 1304 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1304

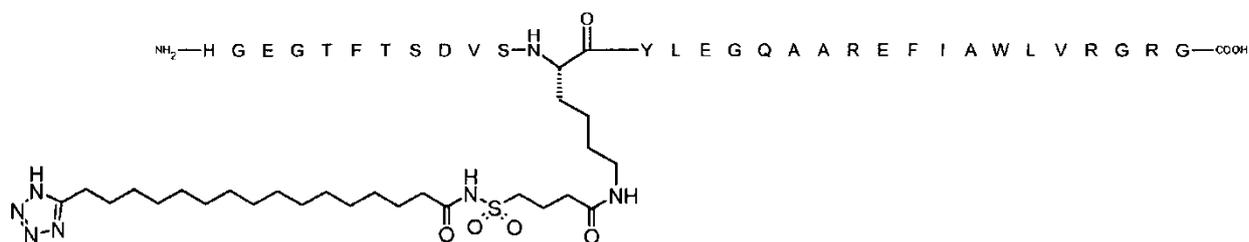
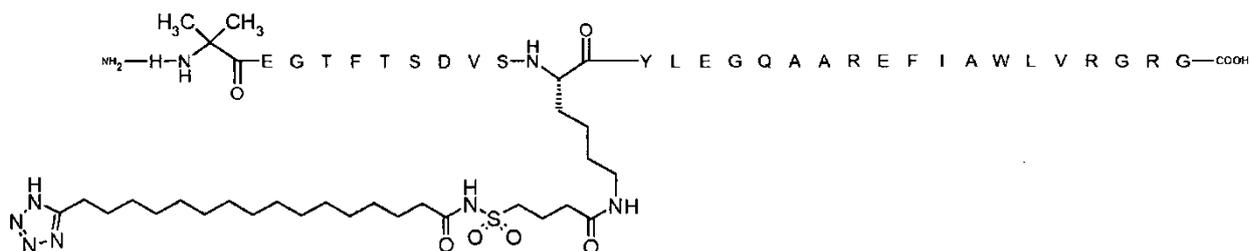
Compuestos que se planea sintetizar a lo largo de los procedimientos descritos anteriormente son:

Ejemplo comparativo 47**10 Péptido N^{ε18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)**

El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 4-(16-(5-tetrazolil)hexadecanoilaminosulfonil)butírico y péptido [Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37) (80 mg). Se obtuvieron 14,5 mg del producto del título.

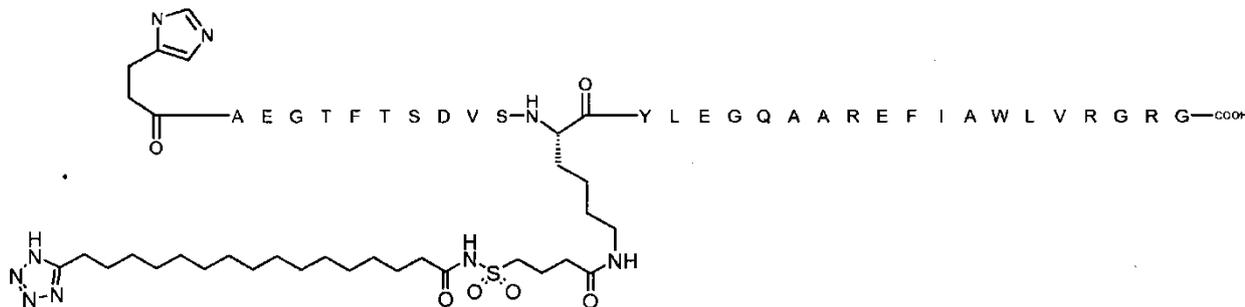
15 HPLC (procedimiento B4): TR = 9,11 min (100 %)

CLEM: m/z = 1304 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1304

Ejemplo comparativo 48**Péptido N^{ε18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Gly8;Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)****20 Ejemplo comparativo 49****Péptido N^{ε18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Aib8,Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)**

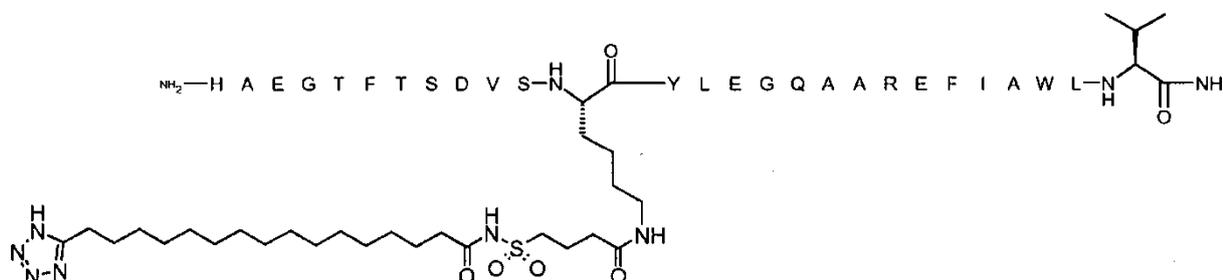
Ejemplo comparativo 50

Péptido N^{E18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[3-(4-imidazolil)propionil7;
Lys18;Arg26,34]GLP-1-(7-37)



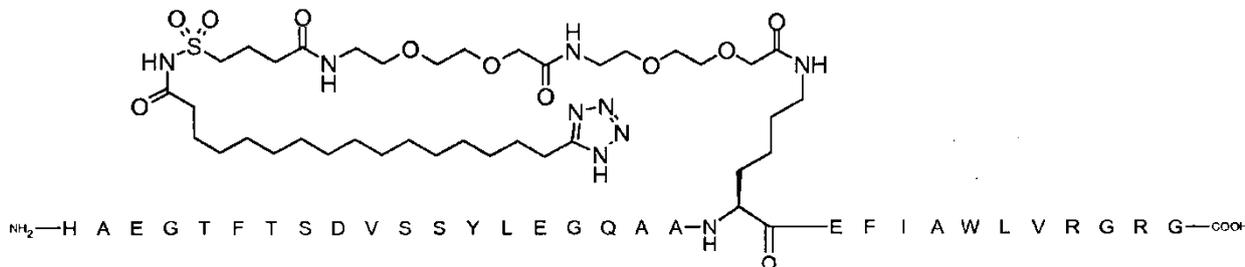
5 **Ejemplo comparativo 51**

Peptidoamida N^{E18}-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)[Lys18;Arg26]GLP-1-(7-33)



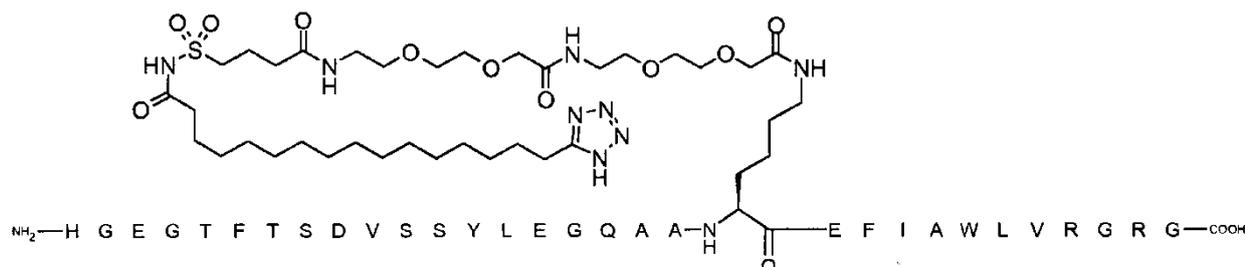
Ejemplo comparativo 52

10 **Péptido** N^{E26}-((2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)-[Arg34]GLP-1-(7-37)



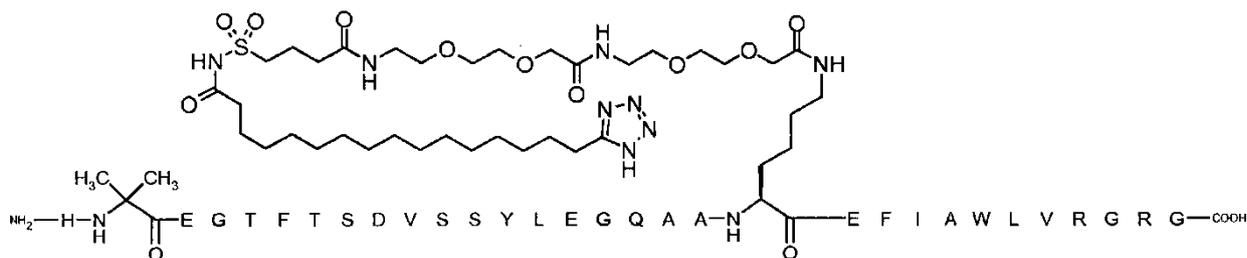
Ejemplo comparativo 53

Péptido N^{E26}-((2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)[Gly8,Arg 34]GLP-1-(7-37)



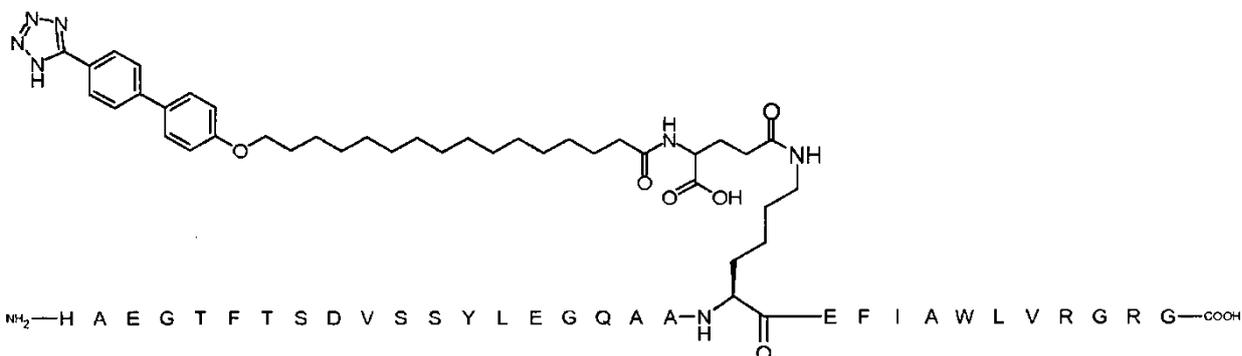
15 **Ejemplo comparativo 54**

Péptido N^{E26}-((2-(2-(2-(2-(4-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)-[Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)



Ejemplo comparativo 55

Péptido N^ε26-(4-(16-(4-(4-(5-Tetrazolil)fenil)feniloxi)hexadecanoilamino)-(4S)-4-carboxibutiril)-[Arg34]GLP-1-(7-37)



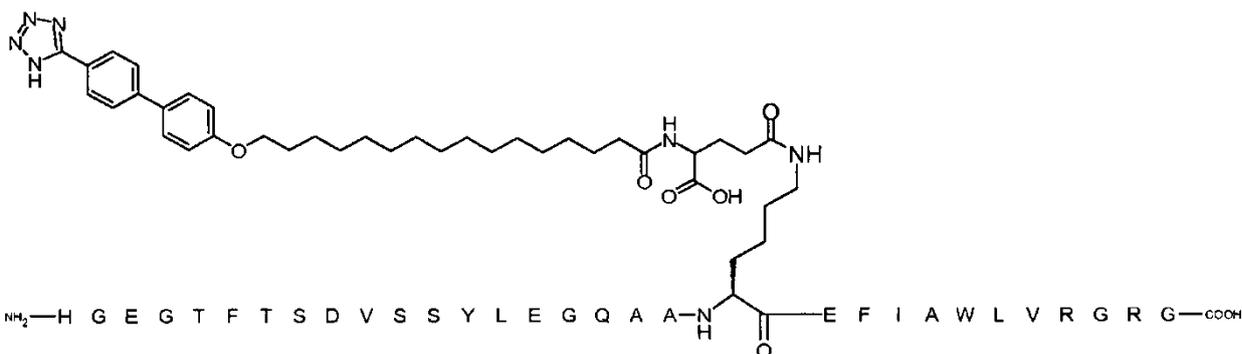
5

El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido 4-(16-(4-(4-(5-tetrazolil)fenil)feniloxi)hexadecanoilamino)-(4S)-4-terc-butoxicarbonilbutírico y péptido [Arg34]GLP-1-(7-37) (75 mg). Se obtuvieron 6,9 mg del producto del título.

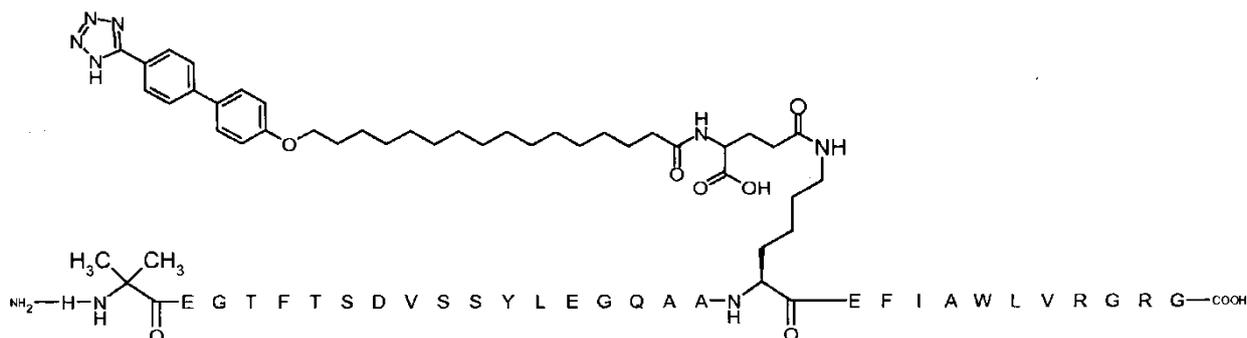
HPLC (procedimiento B4): TR = 10,57 min (100 %)

10 CLEM: m/z = 1330 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1330

Ejemplo comparativo 56

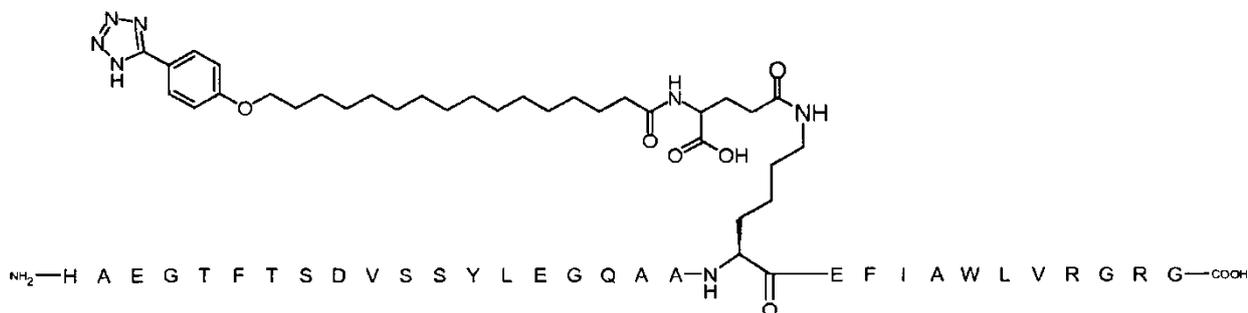


Ejemplo comparativo 57



Ejemplo comparativo 58

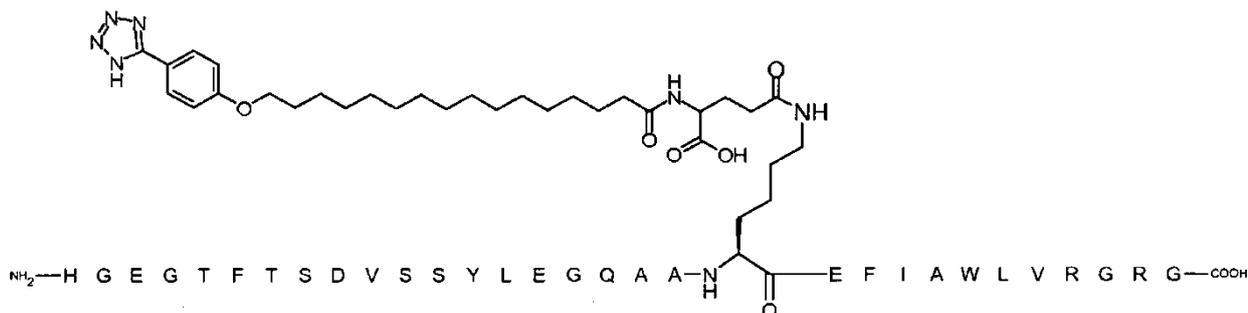
Péptido N^{ε26}-(4-{16-[4-(1H-tetrazol-5-il)fenoxi]hexadecanoilamino}-(4S)-4-carboxibutiril)-[Arg34] GLP-1-(7-37)



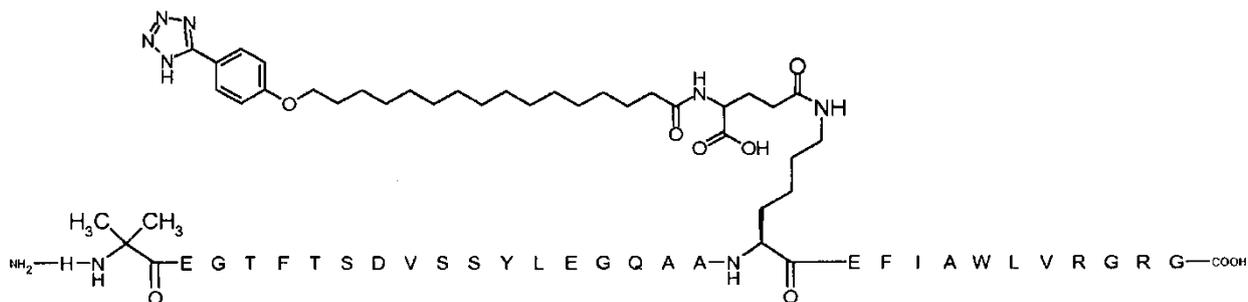
5 El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido (4-{16-[4-(1H-tetrazol-5-il)fenoxi]hexadecanoilamino}-(4S)-4-terc-butoxicarbonilbutírico y péptido [Arg34]GLP-1-(7-37). Se obtuvieron 1,6 mg del producto del título.

HPLC (procedimiento B4): TR = 9,96 min (100 %)

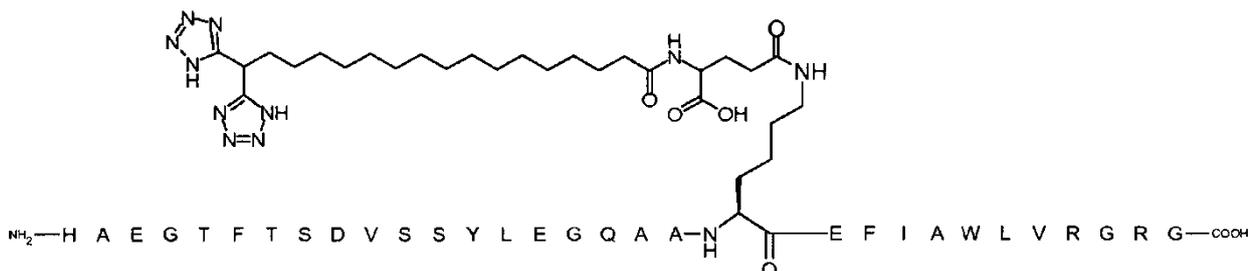
CLEM: m/z = 1305 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1305

Ejemplo comparativo 59

10

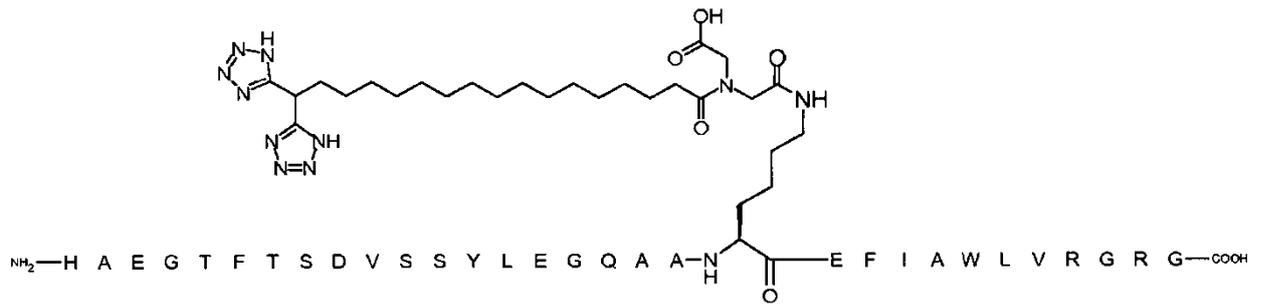
Ejemplo comparativo 60**Ejemplo comparativo 61**

Péptido N^{ε26}-(4-[17,17-Bis-(1-H-tetrazol-5-il)heptadecanoilamino]-(4S)-4-carboxibutiril)-[Arg34]GLP-1-(7-37)

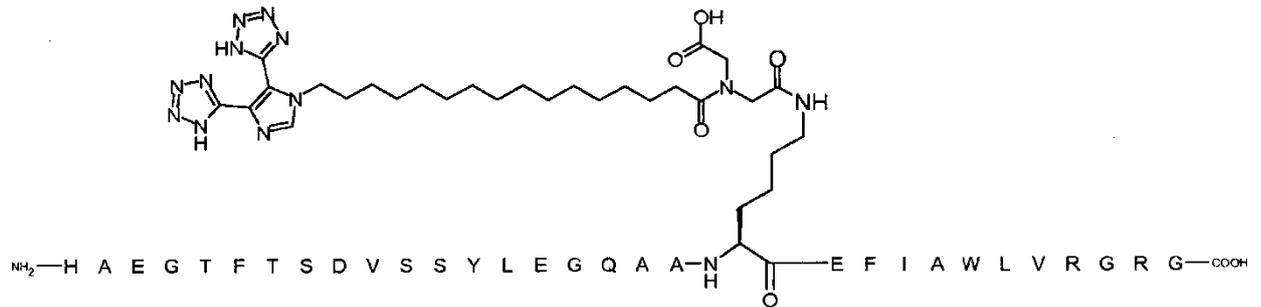


15

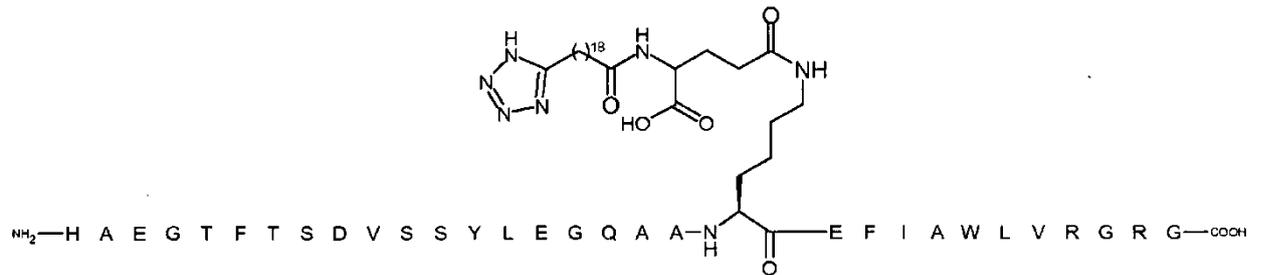
El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido {4-[17,17-bis-(1-H-tetrazol-5-



Ejemplo comparativo 70

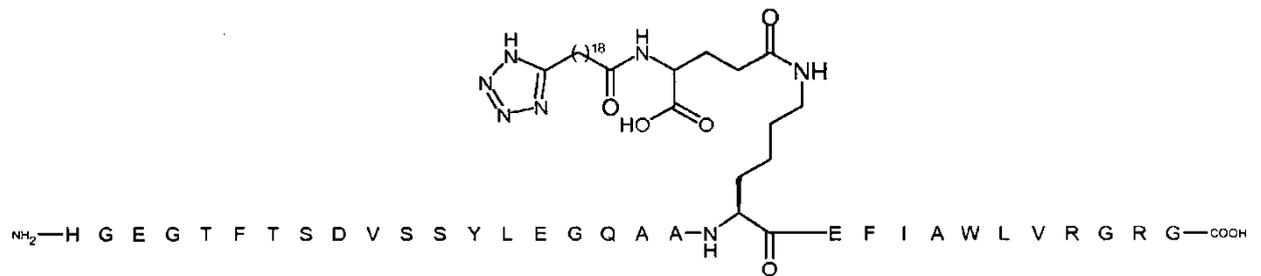


Ejemplo comparativo 71



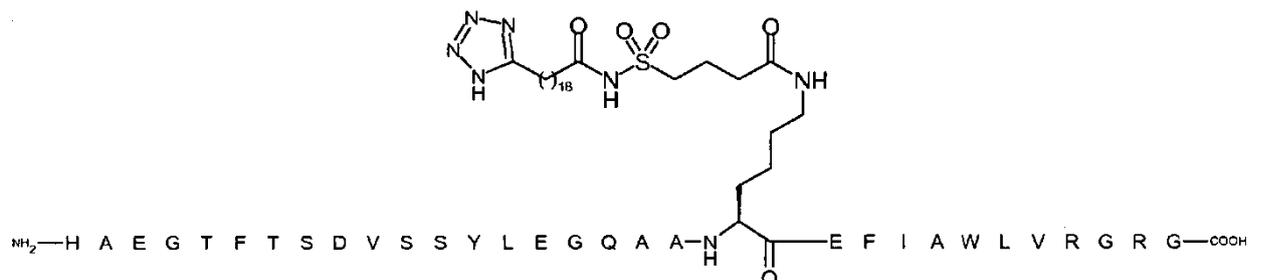
5

Ejemplo comparativo 72



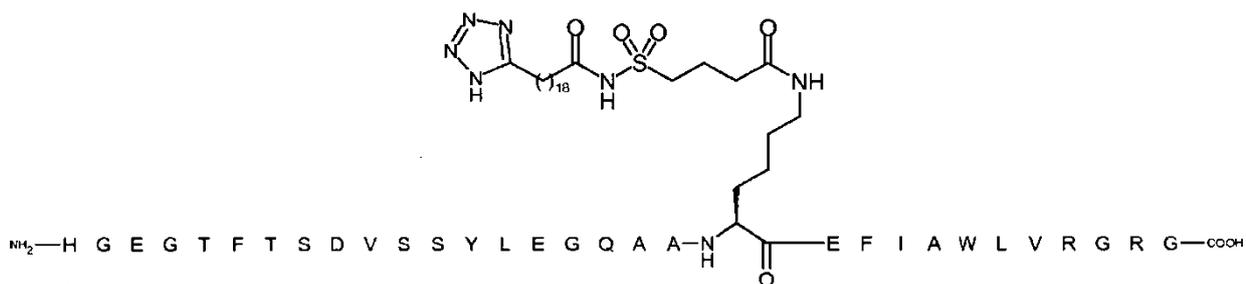
Ejemplo comparativo 73

Péptido N^{E26}-(4-(19-(Tetrazol-5-il)nonadecanoilsulfamoil)butiril)[Arg34]GLP-1-(7-37)

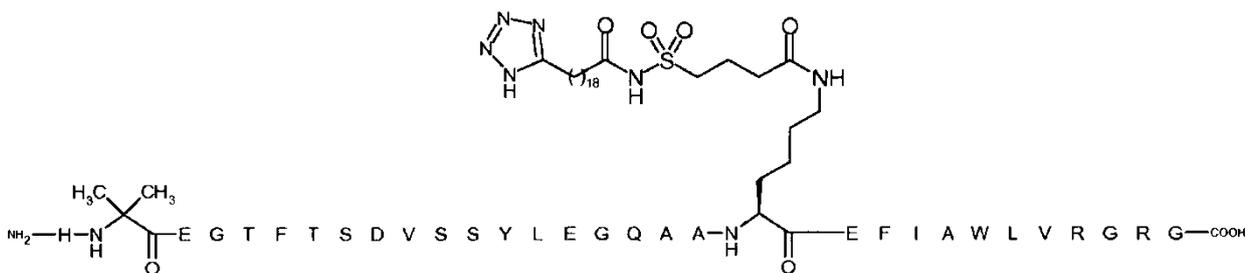


10

Ejemplo comparativo 74

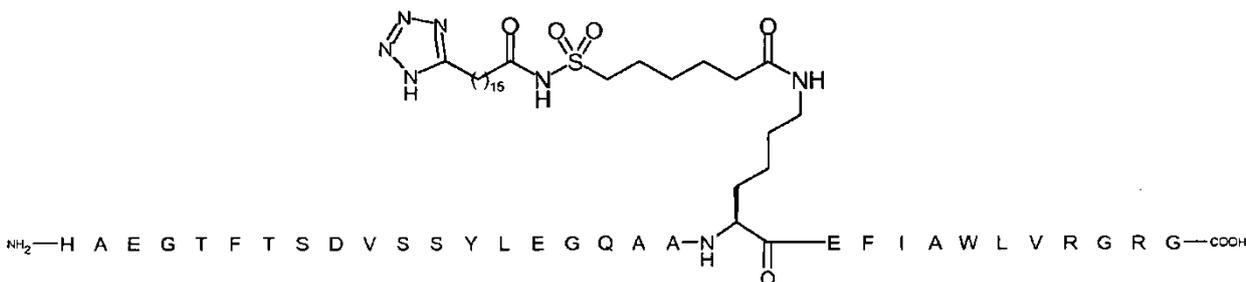


Ejemplo comparativo 75



Ejemplo comparativo 76

- 5 N^{ε26}-(6-{16-[1H-Tetrazol-5-il]hexadecanoil}sulfamoilhexanoil)[Arg34]GLP-1-(7-37)

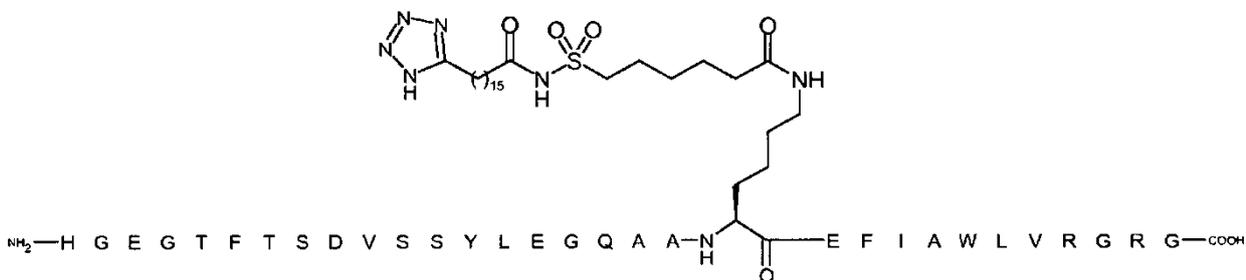


El compuesto del título se preparó como el ejemplo 6 a partir de ácido (6-{16-[1H-tetrazol-5-il]hexadecanoil}sulfamoilhexanoico y péptido [Arg34]GLP-1-(7-37). Se obtuvieron 67,5 mg del producto del título.

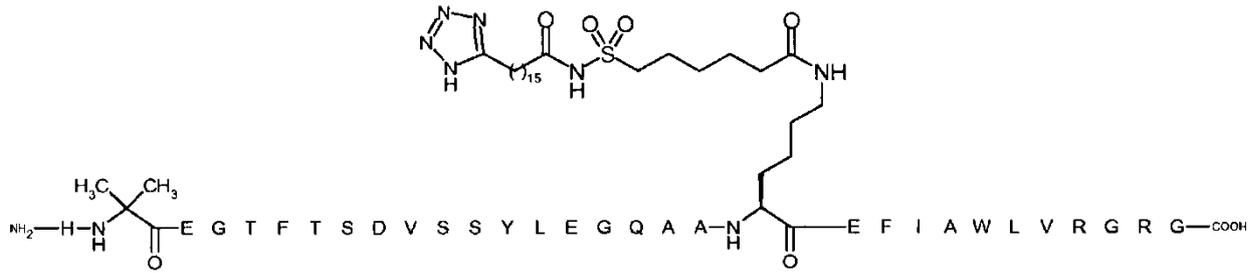
HPLC (procedimiento B4): TR = 11,08 min (98 %)

- 10 CLEM: m/z = 1290 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1290

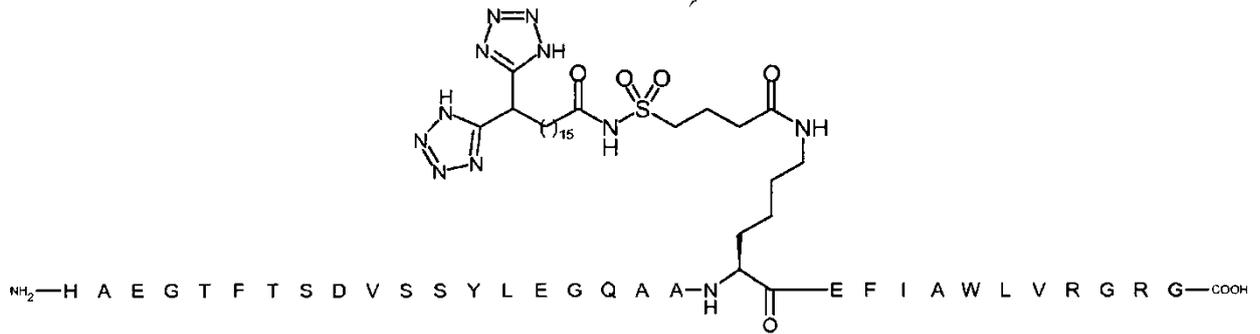
Ejemplo comparativo 77



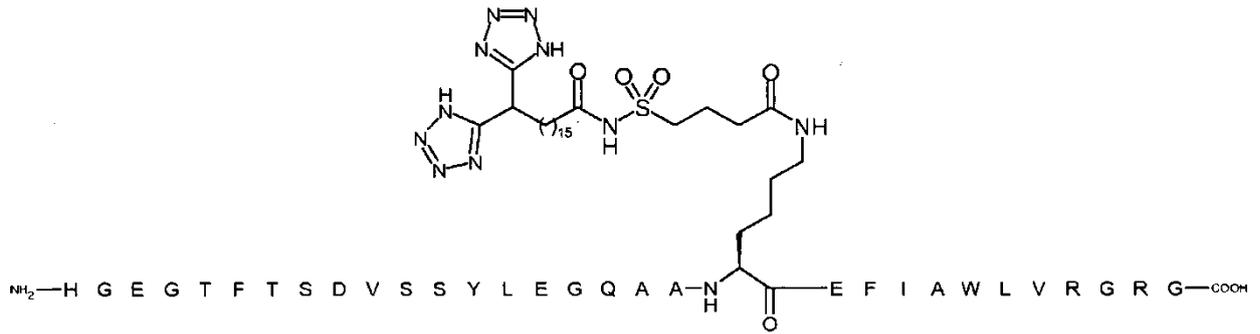
Ejemplo comparativo 78



Ejemplo comparativo 79

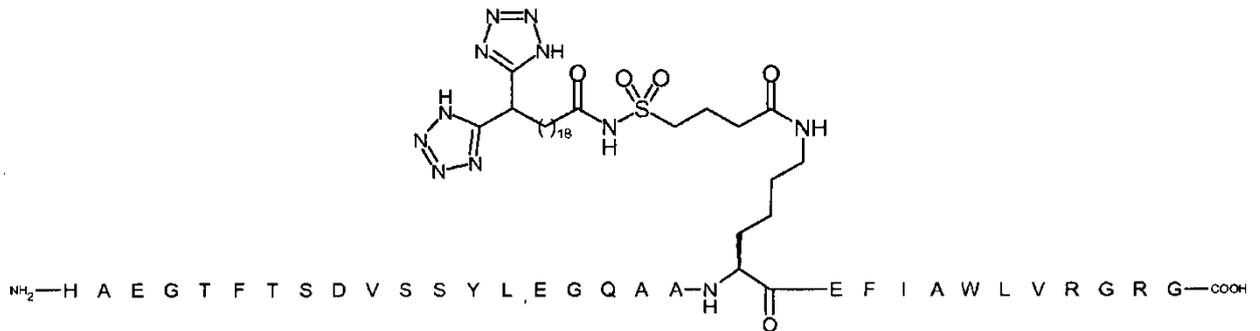


Ejemplo comparativo 80

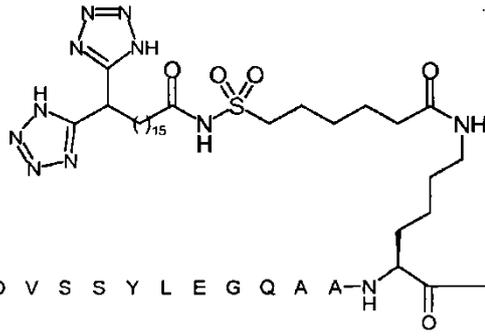


5

Ejemplo comparativo 81

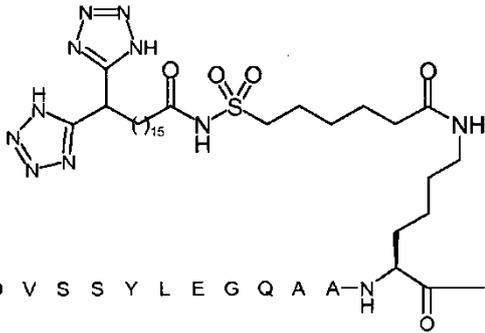


Ejemplo comparativo 82



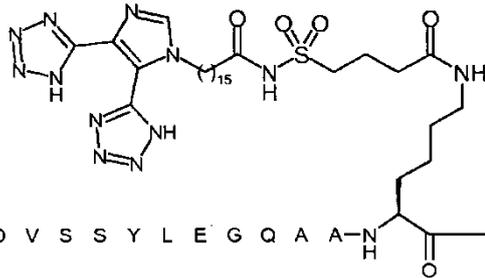
NH₂—H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A—NH—C(=O)—E F I A W L V R G R G—COOH

Ejemplo comparativo 83



NH₂—H G E G T F T S D V S S Y L E G Q A A—NH—C(=O)—E F I A W L V R G R G—COOH

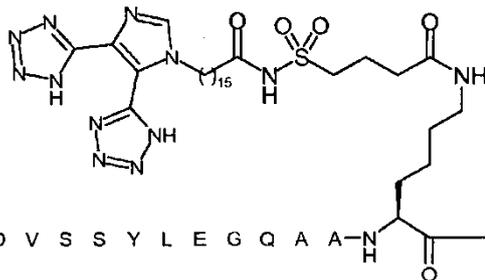
Ejemplo comparativo 84



NH₂—H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A—NH—C(=O)—E F I A W L V R G R G—COOH

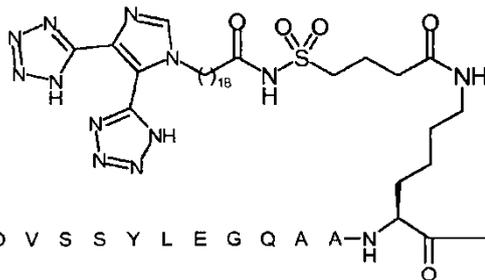
5

Ejemplo comparativo 85



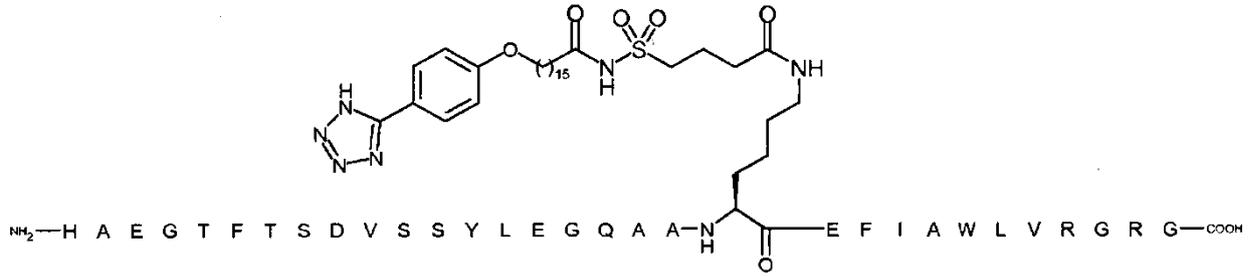
NH₂—H G E G T F T S D V S S Y L E G Q A A—NH—C(=O)—E F I A W L V R G R G—COOH

Ejemplo comparativo 86

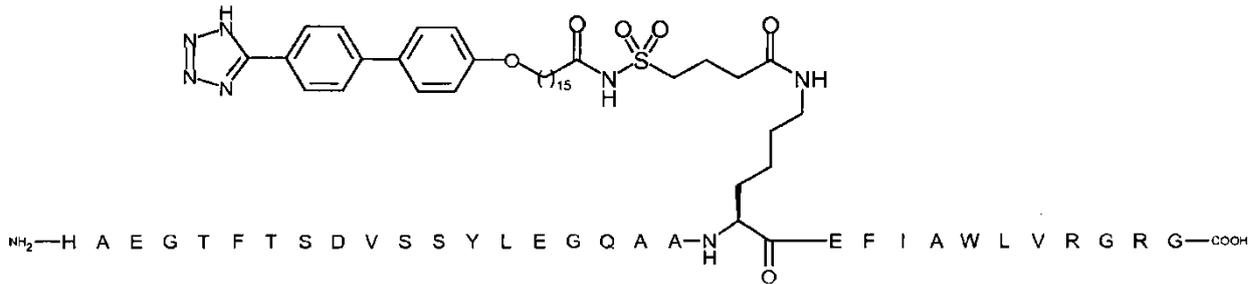


NH₂—H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A—NH—C(=O)—E F I A W L V R G R G—COOH

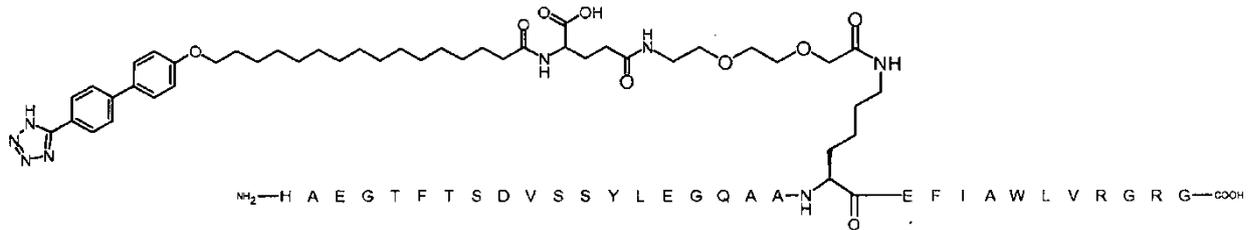
Ejemplo comparativo 87



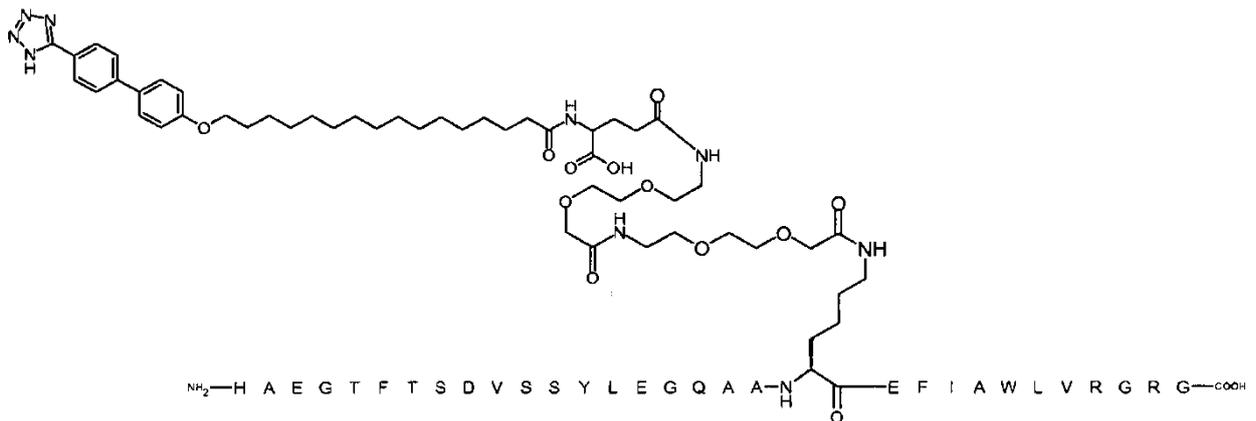
Ejemplo comparativo 88



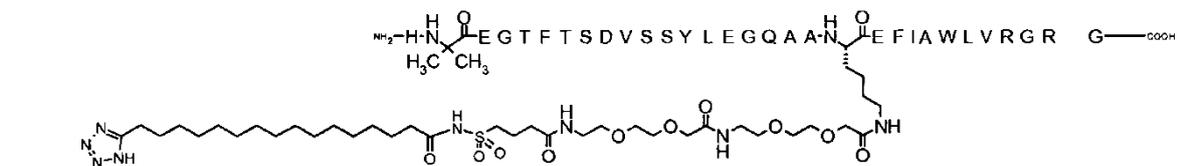
5 Ejemplo comparativo 89



Ejemplo comparativo 90

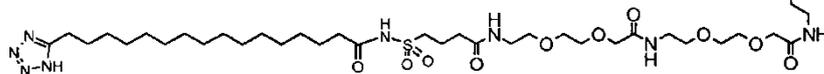


Ejemplo comparativo 91



10

Ejemplo comparativo 92

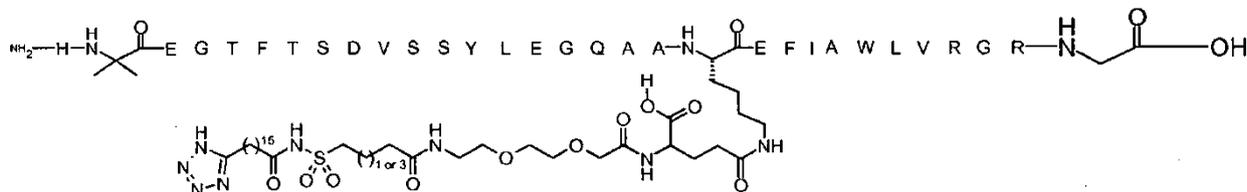


carboxibutiril] [Aib8,Arg34] GLP-1 (7-37)

o

N^{E26}-[4(S)-4-(2-(2-(2-(6-(N-(16-(1-H-tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)hexanoilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)-4-carboxibutiril]

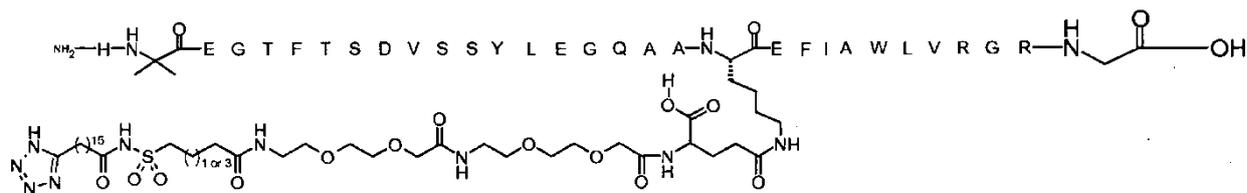
5 [Aib8,Arg34] GLP-1 (7-37)



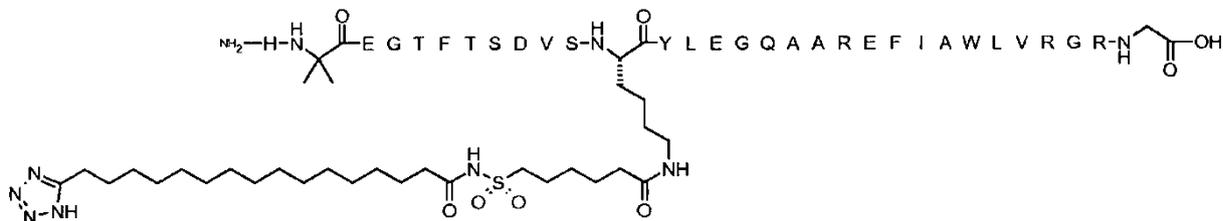
N^{E26}-[4(S)-4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(N-(16-(1-H-tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)butirilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)-4-carboxibutiril] [Aib8,Arg34] GLP-1 (7-37)

10 o

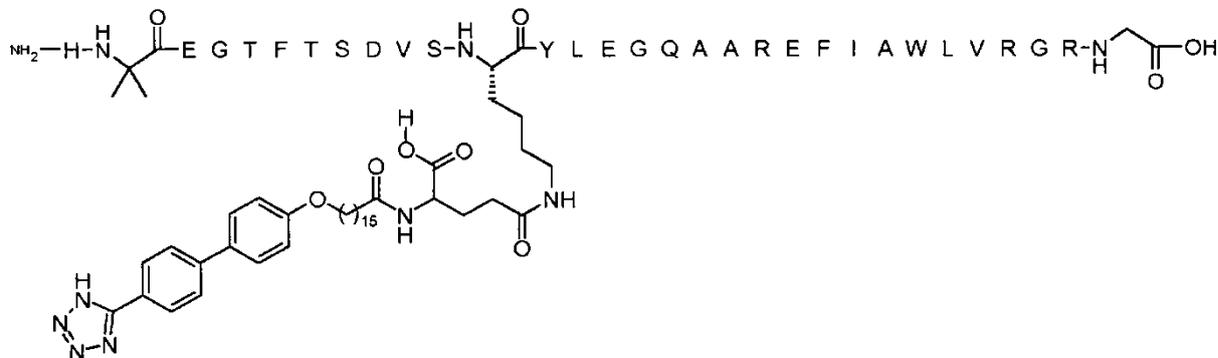
N^{E26}-[4(S)-4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(6-(N-(16-(1-H-tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)hexanoilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)-4-carboxibutiril] [Aib8,Arg34] GLP-1 (7-37)



15 N^{E18}-6-(16-[1-H-tetrazol-5-il]hexadecanoilsulfamoil)hexanoil [Aib8,Arg26,34] GLP-1 (7-37)

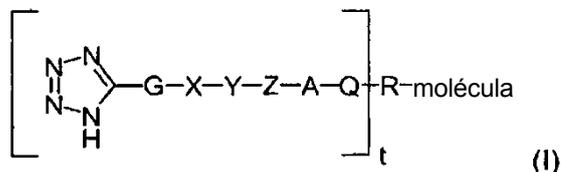


N^{E18}-[4(S)-4-(16-[4-[4-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]fenoxi)hexadecanoilamino)-4-carboxibutiril] [Aib8,Arg26,34] GLP-1 (7-37)



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



en la que

5 G, X e Y representan independientemente

un enlace, -S-, -O-, -NH-, $-(CH_2)_{1-10}$ -, o

arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

10 heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, y

Z representa un enlace o

$-(CH_2)_n$ -, $-O-(CH_2)_n$ -, $-S-(CH_2)_n$ -, $-(OCH_2CH_2)_n$ -, $-(CF_2)_n$ -, $-O-CH_2-(CF_2)_n$ -, $-S-CH_2-(CF_2)_n$ -, en los que n es 1-40 y A representa -C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, $-S(=O)_2NH-C(=O)-$, $-(CH_2)_{1-5}$ -, $-O-(CH_2)_{1-5}$ -, u $-O-(CH_2)_{1-5}-C(=O)-$ y

15 Q representa un enlace o

$-[NH-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)]_q$ -, o

$-O-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)-$, o

$-S-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-E-C(=O)-$, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y R representa un enlace o un poli-radical, tal como $[NH(CH_2)_4CH(NH-FC(=O))]_{1-5}$ y

20 t es 1-40, y

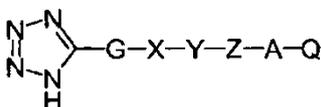
la molécula es exendina-4 o un análogo de la misma que comprende no más de doce residuos de aminoácido que se han intercambiado, añadido o deleccionado en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2).

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que G, X e Y son todos un enlace.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que G, X e Y son seleccionados todos de $-(CH_2)_{1-10}$.

25 4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que t es 1.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que



30 es 16-(5-tetrazolil)hexadecanoilo, 4-[N-(16-{5-tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butirilo, 2-(2-(2-(16-(tetrazol-5-il)(hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetilo) o [2-(2-[[2-(2-carbamoilmetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etil]amida del ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo ε-amino de un residuo de lisina.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la molécula se une covalentemente a R mediante el grupo tiol de un residuo de cisteína.

35 8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha molécula comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula (IV):

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-
Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-
Xaa₄₀-Xaa₄₁-Xaa₄₂-Xaa₄₃-Xaa₄₄-Xaa₄₅-Xaa₄₆**

Fórmula (III) (SEQ ID N.º: 3)

en la que

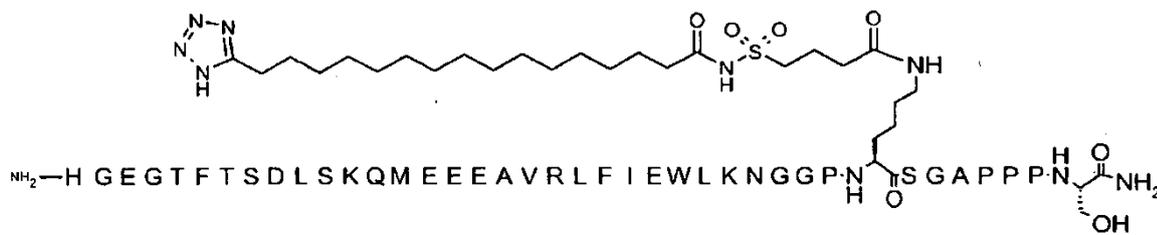
- 5 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, ácido 2-amino-3-(2-aminoimidazol-4-il)propiónico, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico, ácido 1-aminociclobutanocarboxílico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclohexanocarboxílico, ácido 1-aminocicloheptanocarboxílico, o ácido 1-aminociclooctanocarboxílico;
- 10 Xaa₁₆ es Val o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
- Xaa₁₉ es Tyr o Gln;
- Xaa₂₀ es Leu o Met;
- Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys o Arg;
- 15 Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₆ es Lys, Glu o Arg;
- Xaa₂₇ es Glu o Leu;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;
- Xaa₃₃ es Val o Lys;
- 20 Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly o Aib;
- Xaa₃₆ es Arg, Gly o Lys;
- Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente;
- Xaa₃₈ es Lys, Ser, amida o está ausente;
- 25 Xaa₃₉ es Ser, Lys, amida o está ausente;
- Xaa₄₀ es Gly, amida o está ausente;
- Xaa₄₁ es Ala, amida o está ausente;
- Xaa₄₂ es Pro, amida o está ausente;
- Xaa₄₃ es Pro, amida o está ausente;
- 30 Xaa₄₄ es Pro, amida o está ausente;
- Xaa₄₅ es Ser, amida o está ausente;
- Xaa₄₆ es amida o está ausente;
- con la condición de que si Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ o Xaa₄₆ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido cadena abajo también estará ausente.
- 35 **9.** Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de exendina-4 comprende no más de ocho residuos de aminoácido que se han intercambiado, añadido o deleccionado en comparación con exendina-4(1-39)

(SEQ ID N.º: 2).

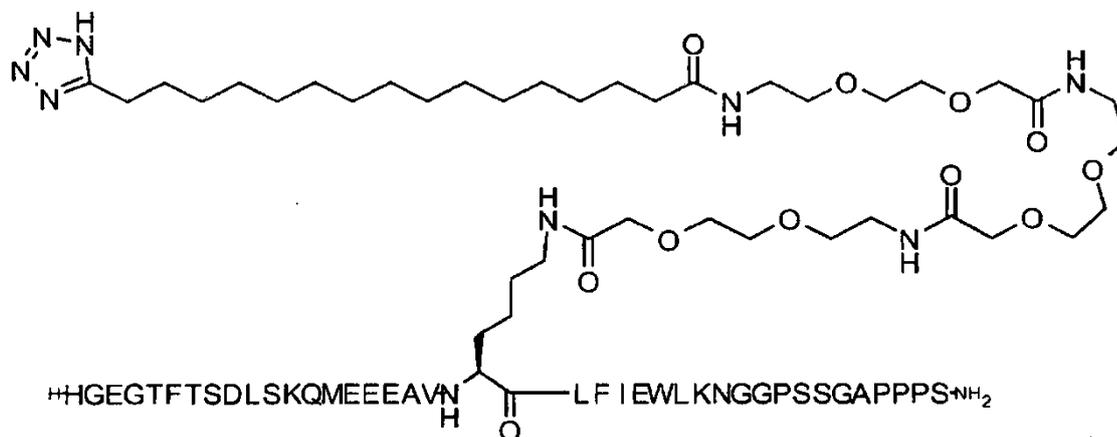
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9, en el que la molécula es ZP-10, es decir, HEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKK-amida (SEQ ID N.º: 5).

11. Un compuesto seleccionado entre los siguientes:

5 péptido N-epsilon32-(4-[N-(16-{5-Tetrazolil}hexadecanoil)sulfamoil]butiril)-[Lys32]Exendina[1-39],



N-epsilon20-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(16-(Tetrazol-5-il)hexadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)[Lys20] Exendina-4 (1-39)amida y



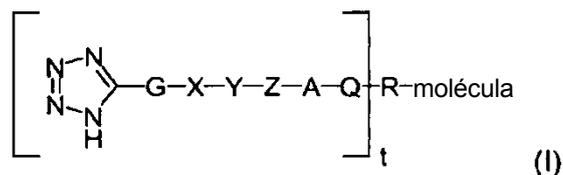
10 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos asociados con hipervolemia tóxica, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria, apoplejía y otros trastornos cardiovasculares, síndrome inflamatorio del intestino, dispepsia y úlceras gástricas; para la preparación de un medicamento para retardar o prevenir el progreso de la enfermedad de diabetes tipo 2; y/o para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β , estimular la generación de células β y/o para restaurar la sensibilidad a glucosa en las células β .

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso como medicamento.

15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos asociados con hipervolemia tóxica, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria, apoplejía y otros trastornos cardiovasculares, síndrome inflamatorio del intestino, dispepsia y úlceras gástricas; para retardar o prevenir el progreso de la enfermedad de diabetes tipo 2; y/o para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de células β y la masa de células β , estimular la generación de células β y/o para restaurar la sensibilidad a glucosa en las células β .

16. Un procedimiento para aumentar la semi-vida en plasma de una molécula, que comprende convertir dicha molécula en un compuesto de fórmula general (I):



en la que

G, X e Y representan independientemente

un enlace, -S-, -O-, -NH-, -(CH₂)₁₋₁₅-, -C(O)NH-, o

- 5 arileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, o

heteroarileno, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, amino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, hidroxilo, MeCONH-, alcanóilo, o ciano, y

Z representa un enlace o

- 10 -(CH₂)_n-, -O-(CH₂)_n-, -S-(CH₂)_n-, -(OCH₂CH₂)_n-, -(CF₂)_n-, -O-CH₂-(CF₂)_n-, -S-CH₂-(CF₂)_n-, en los que n es 1-40, y

A representa

-C(=O)-, -O-C(=O)-, -NH-C(=O)-, -C(C=O)NH-S(=O)₂-, -S(=O)₂NH-C(=O)-, -(CH₂)₁₋₅-, -O-(CH₂)₁₋₅-, o

-O-(CH₂)₁₋₅-C(=O)- y

Q representa un enlace, o

- 15 -[NH-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)]_q-, o

-O-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, o

-S-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-E-C(=O)-, en los que E es un enlace, O, S, o NH y m, p y q son independientemente 1-40 y R representa un enlace o un poli-radical, tal como [-NH(CH₂)₄CH(NH-)-C(=O)-]₁₋₅, y

t es 1-40 y

- 20 la molécula es exendina-4 o un análogo de la misma que comprende no más de doce residuos de aminoácido que han sido intercambiados, añadidos o delecionados en comparación con exendina-4(1-39) (SEQ ID N.º: 2).