(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 561 658**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010** **E 10788095 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015** **EP 2513140**

(54) Título: **Derivados de GLP-1 con doble acilación**

(30) Prioridad:

21.12.2009 US 288601 P
16.12.2009 EP 09179390

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.02.2016

(73) Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

(72) Inventor/es:

GARIBAY, PATRICK WILLIAM;
SPETZLER, JANE;
KODRA, JÁNOS TIBOR;
LINDEROTH, LARS;
LAU, JESPER y
SAUERBERG, PER

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 658 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

Derivados de GLP-1 con doble acilación

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a derivados del Péptido 1 Afín a Glucagón (GLP-1) y su uso farmacéutico, es decir a derivados de GLP-1 con doble acilación, acilados en posición 26 y 37, y su uso farmacéutico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, no. 9, p. 1664-669 da a conocer derivados de GLP-1 (7-37) que están doblemente acilados en $K^{26,34}$ - véase Tabla 1.

WO 98/08871 da a conocer varios derivados de GLP-1 que incluyen algunos que están doblemente acilados en $K^{26,34}$, véanse los Ejemplos 3, 7,17, 24,32, 33, y 36. Liraglutida, un derivado mono-acilado de GLP-1 para administración una vez al día que está comercializado desde 2009 por Novo Nordisk A/S, se describe también en WO 98/08871 (Ejemplo 37).

WO 99/43706 da a conocer varios derivados de GLP-1 mono- y di-acilados que incluyen varios derivados k ^{26,37} (véase p. 148-178).

WO 2005/ cero 27.978 da a conocer varios derivados de GLP-1 que incluyen algunos que están doblemente acilados en uno y el mismo residuo, K^{37}, véanse los ejemplos 8 y 9.

WO 2009/030.738 da a conocer varios derivados de GLP-1 que incluyen uno doblemente acilado en K^{31}, Dap34, véase el ejemplo 37.

Journal of Controlled Release (2010), vol. 144, p. 10-16 se refiere a análogos acilados de exendina-4 describiéndose, entre otras, una exendina-4 doblemente acilada ($K^{12,27}$-diLUA-Exendin-4) (LUA es ácido láurico, C 12).

WO 06/097.537 da a conocer varios derivados de GLP-1 que incluyen semaglutida (Ejemplo 4), un derivado mono-acilado de GLP-1 para administración una vez a la semana, que se halla en desarrollo por Novo Nordisk A/S.

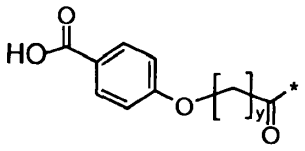
Angewandte Chemie International Edition 2008, vol. 47, p. 3196-3201 informa del descubrimiento y la caracterización de una clase de derivados de ácido 4-(p-yodofenil)butírico que supuestamente presentan una interacción de fijación estable no covalente a la vez con seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina humana (HSA).

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a derivados de péptidos GLP-1.

Los derivados están acilados en la lisina nativa en posición 26, así como en una lisina sustituida en lugar de la glicina nativa en posición 37. Las cadenas laterales son restos de fijación de albúmina. Las mismas comprenden un resto de prolongación seleccionado de ácidos grasos con un grupo fenoxi distal. Un grupo carboxi del ácido graso está acilado, opcionalmente por un enlazador, a un residuo lisina del péptido GLP-1, preferiblemente en el grupo épsilon-amino del mismo. El péptido GLP-1 puede ser un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) que tiene un total de hasta 10 diferencias de aminoácidos comparado con GLP-1 (7-37), por ejemplo una o más adiciones, una o más deleciones, y/o una o más sustituciones.

De modo más particular, la invención se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, análogo que comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa k 26, análogo que tiene un máximo de 10 modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), con inclusión de k 37 y un Q o un R en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37); derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación de fórmula Chem. 2a:



,

en la cual y es un número entero en el intervalo de 7-15; o una sal, amida, o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere también a un derivado de este tipo para uso como medicamento, en particular para uso en el tratamiento y/o la prevención de todas formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

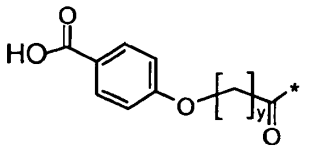
La invención se refiere adicionalmente a productos intermedios en la forma de péptidos GLP-1, y cadenas laterales, que son relevantes para la preparación de ciertos péptidos GLP-1 y derivados de la invención.

Los derivados la invención son biológicamente activos. Además, o alternativamente, tienen un perfil farmacocinético prolongado. También, o alternativamente, son estables contra la degradación por las enzimas gastrointestinales. También, o alternativamente, tienen una biodisponibilidad oral alta. Estas propiedades son importantes en el desarrollo de compuestos GLP-1 de próxima generación, para administración subcutánea, i.v., y/o particularmente oral.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a derivados de péptidos GLP-1. Los derivados están acilados en la lisina nativa en posición 26, así como en una lisina sustituida en lugar de la glicina nativa en posición 37. Las cadenas laterales son restos de fijación de albúmina. Las mismas comprenden un resto de prolongación seleccionado de ácidos grasos con un grupo fenoxi distal o terminal. Un grupo carboxi del ácido graso está acilado, opcionalmente por un enlazador, a un residuo lisina del péptido GLP-1, preferiblemente en el grupo épsilon amino del mismo. El péptido GLP-1 puede ser un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) que tiene un total de hasta 10 diferencias de aminoácidos comparado con GLP-1 (7-37), por ejemplo una o más adiciones, una o más deleciones, y/o una o más sustituciones.

De modo más particular, en un primer aspecto, la invención se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, análogo que comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición que corresponde a la posición 26 de GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26}, análogo que tiene un máximo de 10 modificaciones de aminoácido, comparado con GLP-1 (7-37), y un Q y/o un R con inclusión de K^{37} y un Q o un R en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37); derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación de fórmula Chem. 2a:



,

en la cual y es un número entero en el intervalo de 7-15; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo. Y finalmente, la invención se refiere también al uso farmacéutico de los derivados de la invención, en particular para uso en el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células beta, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

En lo que sigue, las letras griegas pueden representarse por su símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc. Asimismo, la letra griega μ puede representarse por "u", v.g. en μl=ul, o en μM=uM.

Un asterisco (*) en una fórmula química designa i) un punto de unión, ii) un radical, y/o iii) un electrón no compartido.

Análogos de GLP-1

El término “GLP-1 análogo” o “análogo de GLP-1”, como se utiliza en esta memoria, se refiere a un péptido, o un compuesto que es una variante del Péptido-1 Afín a Glucagón humano (GLP-1 (7-37)), cuya secuencia se incluye en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 1. El péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 pueden designarse también GLP-1 “nativo”.

En el listado de secuencias, se asigna el número 1 al primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO: 1 (histidina). No obstante, en lo que sigue - conforme a la práctica establecida en la técnica - se hace referencia a este residuo

histidina como número 7, y los residuos de aminoácido subsiguientes se numeran de acuerdo con ello, terminando con la glicina número 37. Por esta razón, generalmente, cualquier referencia en esta memoria a un número de residuo de aminoácido o un número de posición de la secuencia de GLP-1 (7-37) designa la secuencia que comienza con His en posición 7 y termina con Gly en posición 37.

Los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención pueden describirse por referencia a i) el número del residuo de aminoácido en GLP-1 (7-37) nativo que corresponde a residuo de aminoácido que se modifica (es decir, la posición correspondiente en GLP-1 nativo), y a ii) la modificación actual. Los siguientes son ejemplos no limitantes de nomenclatura análoga adecuada.

Un ejemplo no limitante de un análogo de GLP-1 del derivado de la invención es un análogo que está modificado sólo de modo que comprende un primer residuo lisina en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37). La secuencia de aminoácidos de este análogo es idéntica por lo demás a la de GLP-1 nativo, y este análogo puede designarse K^{37}- GLP-1 (7-37). Esta designación representa la secuencia de aminoácidos de GLP-1 nativo en la que la glicina en posición 37 ha sido sustituida con lisina.

Este análogo de GLP-1 del derivado de la invención comprende además un segundo residuo lisina en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37). Dado que la secuencia de aminoácidos de este análogo es idéntica por lo demás a la de GLP-1 nativo, dicho análogo se designa, todavía, K^{37}-GLP-1 (7-37), puesto que K^{26} está implicado por la referencia a GLP-1 (7-37) nativo, SEQ ID NO: 1.

Conforme a ello, K^{37}-GLP-1 (7-37) designa un análogo de GLP-1 (7-37 en el que la glicina existente naturalmente en posición 37 ha sido sustituida con lisina.

El término “análogo de K^{37}-GLP-1 (7-37)” se refiere a un análogo de GLP-1 (7-37) que comprende la modificación K^{37} y al menos una modificación adicional, comparado con GLP-1 (7-37).

El análogo de GLP-1 que forma parte del derivado de la invención comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y un máximo de 10 modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26}. Dicho de otro modo, se trata de un péptido GLP-1 (7-37) modificado en el que un número de residuos de aminoácido se ha cambiado comparado con el GLP-1 (7-37) nativo (SEQ ID NO: 1). Estos cambios, o modificaciones, pueden representar, independientemente, una o más sustituciones, adiciones, y/o deleciones de aminoácidos.

Otro ejemplo no limitante de un análogo de un derivado de la invención es [Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]GLP-1(7-37), que designa un análogo de GLP-1 (7-37) en el que la alanina en posición 8 ha sido sustituida con ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), la lisina en posición 34 ha sido sustituida con arginina, y la glicina en posición 37 ha sido sustituida con lisina. Este análogo puede designarse también (8Aib, R34, K^{37}) GLP-1 (7-37).

Un ejemplo no limitante adicional de un análogo de un derivado de la invención es un análogo “que comprende 34 E, 34Q, o 34 R”, que se refiere a un análogo de GLP-1 que tiene un ácido glutámico (E), una glutamina (Q), o una arginina (R) en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 nativo (SEQ ID NO:1), y que puede comprender modificaciones adicionales comparado con SEQ ID NO:1.

Otro ejemplo adicional no limitante de un análogo de un derivado de la invención es el análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) que se designa simplemente “(8Aib, 31H, 34Q, 37K)”. Esta designación se refiere a un análogo que es idéntico a SEQ ID NO:1 excepto por estas cuatro sustituciones, es decir un análogo en el que la alanina en posición 8 ha sido sustituida con ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), el triptófano en posición 31 ha sido sustituido con histidina, la lisina en posición 34 ha sido sustituida con glutamina, y la glicina en posición 37 ha sido sustituida con lisina. Este análogo no comprende modificaciones adicionales comparado con SEQ ID NO: 1.

Otro ejemplo no limitante adicional de un análogo de un derivado de la invención es un análogo que comprende des7 (o Des^7), que se refiere a un análogo de GLP-1 (7-37) en el que el aminoácido N-terminal, histidina, ha sido delecionado. Este análogo puede designarse también GLP-1 (8-37).

Análogamente, (des7+des8); (des7, des8); (des7-8); o (Des^7, Des^8) en relación con un análogo de GLP-1 (7-37), en el que puede estar implicada la referencia a GLP-1 (7-37), se refiere a un análogo en el que se han delecionado los aminoácidos correspondientes a los dos aminoácidos N-terminales del GLP-1 nativo, histidina y alanina. Éste análogo puede designarse también GLP-1 (9-37).

Otro ejemplo adicional no limitante de un análogo de un derivado de la invención es un análogo que comprende Imp^7, y/o (Aib^8 o S^8), que se refiere a un análogo de GLP-1 (7-37) que, cuando se compara con GLP-1 nativo, comprende una sustitución de histidina en posición 7 con ácido imidazopropiónico (Imp); y/o una sustitución de alanina en posición 8 con ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), o con serina.

Análogos “que comprenden” ciertas modificaciones especificadas pueden comprender modificaciones adicionales, cuando se comparan con SEQ ID NO: 1. Dos ejemplos, no limitantes, de análogos que comprenden Imp^7, y/o (Aib^8 o S^8), y que forman parte de derivados de la invención son las partes del péptido de Chem. 47 y Chem. 58.

Ejemplos no limitantes de un análogo de GLP-1 (7-37) que comprenden (des7+des8), $Arg^3$4, Lys37, y Glu38 son los siguientes: el péptido [Des^7, Des^8, Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(7-37)-Glu^{38}; y el péptido N^9-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metil-propionil}[Arg^{34}, Lys^{37}] GLP-1(9-37)Glu^{38}. En el último compuesto, un dipéptido mimético del término N de GLP-1 (His-Ala) nativo está unido al término N nuevo, Glu 9, por un enlace amida.

Miméticos His- o His-Ala adecuados que pueden utilizarse como una clase de sustituto para los aminoácidos del terminal N delecionados, en su caso, comprenden una estructura de anillo aromático heterocíclico, que contienen nitrógeno, v.g. piridina o imidazol. Miméticos His- o His-Ala preferidos son derivados de un imidazol o una piridina, distintos de His e His-Ala, teniendo en una realización un sustituyente con un grupo ácido carboxílico libre, que puede formar un enlace amida con un grupo amino del aminoácido N-terminal del péptido. El término imidazol se refiere a imidazoles como una clase de heterociclos con estructura de anillo similar pero con variación de sustituyentes, y viceversa para la piridina.

Como es evidente a partir de los ejemplos anteriores, los residuos de aminoácido pueden identificarse por su nombre completo, su código de una sola letra y/o su código de 3 letras. Estas 3 vías son totalmente equivalentes.

Las expresiones “una posición equivalente a” o “posición correspondiente” pueden utilizarse para caracterizar el sitio de modificación en una secuencia de GLP-1 (7-37) modificada con referencia a GLP-1 nativo (7-37) (SEQ ID NO: 1). Posiciones equivalentes o correspondientes, así como el número de modificaciones, se deducen fácilmente, v.g. por simple escritura a mano y observación visual; y/o puede utilizarse un programa estándar de alineación de proteínas o péptidos, tal como “align”, que es una alineación Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48:443-453, y el programa align por Myers y W. Miller en “Optimal Alignment in Linear Space” CABIOS (aplicaciones de computadora en las ciencias biológicas) (1988) 4: 11-17. Para la alineación, pueden utilizarse la matriz de registro por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad por defecto, y la penalidad para el primer residuo en una laguna puede ajustarse a -12, o preferiblemente a -10, y las penalidades por residuos adicionales en una laguna a -2, o preferiblemente a -0,5.

Un ejemplo de alineación de este tipo se inserta a continuación en esta memoria, en el que la secuencia no. 1 es SEQ ID NO: 1 y la secuencia no. dos es el análogo (des7-8, 34R, 37K, 38E) del mismo:

1: GLP-1(7-37)

2: Análogo de GLP-1(7-37)

Matriz: EBLOSUM62

Penalidad por laguna: 10,0

Penalidad extendida: 0,5

Longitud: 32

Identidad: 27/32 (84,4%)

Semejanza: 28/32 (87,5%)

Lagunas: 3/32 (9,4%)

Registro: 138,0

```
1       1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-      31
            |||||||||||||||||||||||||||:||.
2       1 --EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRKE      30
```

En caso de que se excluyan en la secuencia aminoácidos no naturales tales como Imp y/o Aib, o en el caso de miméticos His-Ala, éstos pueden, para propósitos de alineación, reemplazarse con X. Si se desea, X puede corregirse más tarde manualmente.

El término “péptido”, como se utiliza v.g. en el contexto de los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados por enlaces amida (o peptídicos).

En una realización particular, el péptido está compuesto en gran parte, o predominantemente, por aminoácidos interconectados por enlaces amida (v.g., al menos 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%, en base molar). En otra realización particular, el péptido está constituido por aminoácidos interconectados por enlaces peptídicos.

Los péptidos de la invención comprenden al menos 5 aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. En realizaciones particulares, el péptido comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, aún más preferiblemente al menos 25, o muy preferiblemente al menos 28 aminoácidos.

En realizaciones particulares, el péptido está compuesto de al menos 5 aminoácidos constituyentes, preferiblemente compuesto de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o muy preferiblemente compuesto de al menos 28 aminoácidos.

En realizaciones particulares adicionales, el péptido está a) compuesto de, o b) constituido por, i) 29, ii) 30, iii) 31, o iv) 32 aminoácidos.

En otra realización particular adicional, el péptido está constituido por aminoácidos interconectados por enlaces peptídicos.

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amina y un grupo ácido carboxílico, y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, a los que se hace referencia a menudo como una cadena lateral.

El término “aminoácido” incluye aminoácidos proteogénicos (codificados por el código genético, que incluyen aminoácidos naturales, y aminoácidos estándar), así como aminoácidos no proteogénicos (no encontrados en proteínas, y/o no codificados en el código genético estándar), y aminoácidos sintéticos. Así, los aminoácidos se pueden seleccionar del grupo de aminoácidos proteogénicos, aminoácidos no proteogénicos, y/o aminoácidos sintéticos.

Ejemplos no limitantes de aminoácidos que no están codificados por el código genético son gamma-carboxiglutamato, ornitina, y fosfoserina. Ejemplos no limitantes de aminoácidos sintéticos son los D-isómeros de aminoácidos tales como D-alanina (abreviados a veces en lo que sigue “a” como por ejemplo en “a8”, que, conforme a ello, se refiere a D-ala^{8}) y D- leucina, Aib (ácido alfa-aminoisobutírico), beta-alanina, y des-amino-histidina (desH, nombre alternativo ácido imidazo-propiónico, abreviado Imp).

En lo que sigue, debe entenderse que todos los aminoácidos para los cuales no se indica el isómero óptico se refieren al L- isómero (a no ser que se especifique otra cosa).

Los derivados de GLP-1 y análogos de la invención tienen actividad de GLP-1. Este término se refiere a la capacidad para fijarse al receptor de GLP-1 e iniciar un camino de transducción de señales que da como resultado acción insulinotrópica u otros efectos fisiológicos como es conocido en la técnica. Por ejemplo, los análogos y derivados de la invención pueden testarse respecto a actividad de GLP-1 utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 50 de esta memoria.

Derivados de GLP-1

El término “derivado” como se utiliza en esta memoria en el contexto de un péptido GLP-1 o análogo significa un péptido o análogo de GLP-1 modificado químicamente en el que uno o más sustituyentes se han unido covalentemente al péptido. Puede hacerse también referencia al sustituyente como una cadena lateral.

En una realización particular, la cadena lateral es capaz de formar agregados no covalentes con albúmina, promoviendo con ello la circulación del derivado con el torrente sanguíneo, y teniendo también el efecto de prolongar el tiempo de acción del derivado, debido al hecho de que el agregado del derivado de GLP-1 y albúmina se desintegra sólo lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo. Así, el sustituyente, o cadena lateral, como un todo se designa preferiblemente como resto de fijación de albúmina.

En realizaciones particulares, la cadena lateral tiene al menos 10 átomos de carbono, o al menos 15, 20, 25, 30, 35, o al menos 40 átomos de carbono. En realizaciones particulares adicionales, la cadena lateral puede incluir además como mínimo 5 heteroátomos, en particular O y N, por ejemplo al menos 7,9, 10,12, 15,17, o al menos 20 heteroátomos, tal como al menos 1, 2, o 3 átomos N, y/o al menos 3, 6, 9,12, o 15 átomos O.

En otra realización particular, el resto de fijación de albúmina comprende una porción que es particularmente relevante para la fijación de albúmina y por tanto para la prolongación, porción que a la que puede hacerse referencia de acuerdo con ello como resto de prolongación. El resto de prolongación puede encontrarse en el, o cerca del, extremo opuesto del resto de fijación de albúmina, con relación a su punto de unión al péptido.

En otra realización particular adicional, el resto de fijación de albúmina comprende una porción intercalada entre el resto de prolongación y el punto de unión al péptido, porción a la que puede hacerse referencia como enlazador,

resto enlazador, espaciador, o análogo. El enlazador puede ser opcional, y por tanto en tal caso el resto de fijación de albúmina puede ser idéntico al resto de prolongación.

En realizaciones particulares, el resto de fijación de albúmina y/o el resto de prolongación es lipófilo, y/o está cargado negativamente al pH fisiológico (7,4).

El resto de fijación de albúmina, el resto de prolongación, o el enlazador pueden estar unidos covalentemente a un residuo lisina del péptido GLP-1 por acilación. Química de conjugación adicional o alternativa incluye alquilación, formación de éster, o formación de amida, o acoplamiento a un residuo cisteína, tal como por acoplamiento de maleimida o haloacetamida (tal como acoplamiento bromo-/fluoro-/yodo-).

En una realización preferida, un éster activo del resto de fijación de albúmina, que comprende preferiblemente un resto de prolongación y un enlazador, está unido covalentemente a un grupo amina de un residuo lisina, preferiblemente el grupo amina épsilon del mismo, con formación de un enlace amida (haciéndose referencia a este proceso como acilación).

A no ser que se indique otra cosa, cuando se hace referencia a una acilación de un residuo lisina, se entenderá que se refiere al grupo amina épsilon del mismo.

Un derivado que comprende dos restos de prolongación unidos a K^{26} y K^{37}, opcionalmente por un enlazador, puede designarse como un derivado que ha sido acilado dos veces, doblemente acilado, o sometido a acilación dual en los grupos épsilon-amino de los residuos lisina en posiciones correspondientes a la posición 26 y 37, respectivamente, de GLP-1 (7-37).

Para los propósitos presentes, los términos “resto de fijación de albúmina”, “resto de prolongación”, y “enlazador” pueden incluir tanto las formas de estas moléculas que no han reaccionado como las formas que han reaccionado. Si se trata o no de una o la otra forma estará claro por el contexto en el que se utiliza el término.

La nomenclatura es como se utiliza usualmente en la técnica; por ejemplo en las fórmulas anteriores *-COOH así como HOOC-* se refiere a carboxi; *-C_6H_4 a fenileno; *-CO-*así como *-OC-*, a carbonilo (O=C<**); y C_6H_5-O-* a fenoxi. La masa molar (M) de una sustancia química (tal como el grupo R^1) es la masa de un mol de la sustancia. La masa molar se expresa en dalton, símbolo Da, con la definición 1 Da = 1 gramo/mol.

La masa molar puede calcularse a partir de los pesos atómicos estándar, y a menudo se incluye en los catálogos de productos químicos. La masa molar de un compuesto viene dada por la suma de los pesos atómicos estándar de los átomos que forman el compuesto multiplicada por la constante de masa molar, M_u que es igual a 1 g/mol. Como ejemplo, la masa molecular de terc.butilo (C_4H_9) es M(C_4H_9) = ([4 x 12,01] + [9 x 1,008]) x 1 g/mol = 57 Da.

Los pesos atómicos estándar son publicados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), y se reproducen también en una gran diversidad de libros de texto, catálogos comerciales, cuadros murales, etc.

Como se ha explicado anteriormente, los derivados de GLP-1 de la presente invención están acilados doblemente, es decir dos restos de fijación de albúmina están unidos covalentemente al péptido GLP-1. Los puntos de unión son el residuo lisina nativo en posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y un residuo lisina que se ha empleado en sustitución del residuo glicina en la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37).

En una realización particular, los dos restos de fijación de albúmina (es decir, las cadenas laterales enteras) son similares, con preferencia sustancialmente idénticos o, muy preferiblemente, idénticos.

En otra realización particular, los dos restos de prolongación son similares, con preferencia sustancialmente idénticos, o, muy preferiblemente, idénticos.

En otra realización particular adicional, los dos enlazadores son similares, con preferencia sustancialmente idénticos o, muy preferiblemente, idénticos.

El término “sustancialmente idéntico” incluye diferencias de identidad que son debidas a la formación de uno o más sales, ésteres, y/o amidas; preferiblemente formación de una o más sales, ésteres metílicos, y amidas simples; más preferiblemente formación de no más de dos sales, ésteres metílicos, y/o amidas simples; aún más preferiblemente, formación de no más de una sal, éster metílico, y/o amida simple; o muy preferiblemente, formación de no más de una sal.

En el contexto de compuestos químicos tales como los restos de fijación de albúmina, restos de prolongación, y enlazadores, la semejanza y/o identidad pueden determinarse utilizando cualquier programa de computadora y/o algoritmo adecuado conocido en la técnica.

Por ejemplo, la semejanza de dos restos de prolongación, dos enlazadores, y/o dos cadenas laterales enteras puede determinarse adecuadamente utilizando huellas digitales genéticas moleculares. La huella digital genética es un método matemático de representación de una estructura química (véase v.g. Chemoinformatics: A textbook, Johann Gasteiger y Thomas Engel (Eds), Wiley-VCH Verlag, 2003).

Ejemplos de huellas digitales genéticas adecuadas incluyen, sin limitación, huellas digitales genéticas UNITY, huellas digitales genéticas MDL y/o huellas digitales genéticas ECFP, tales como las huellas digitales genéticas ECFP_6 (ECFP significa huellas digitales genéticas de conectividad extendida).

En realizaciones particulares, los dos restos de prolongación, los dos enlazadores, y/o las dos cadenas laterales enteras se representan como a) huellas digitales genéticas ECFP_6; b) huellas digitales genéticas UNITY; y/o c) huellas digitales genéticas MDL.

El coeficiente de Tanimoto se utiliza preferiblemente para calcular la semejanza de las dos huellas digitales genéticas, se utilicen a), b) o c).

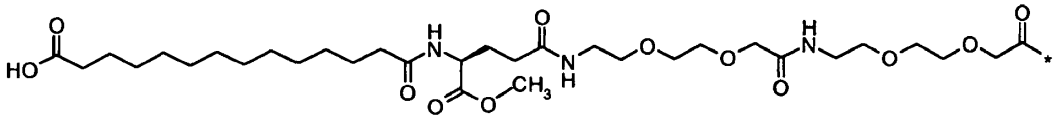
En realizaciones particulares, se utilicen a), b) o c), los dos restos de prolongación, los dos enlazadores, y/o las dos cadenas laterales enteras, respectivamente, tienen una semejanza de al menos 0,5 (50%); preferiblemente al menos 0,6 (60%); más preferiblemente al menos 0,7 (70%), o al menos 0,8 (80%); aún más preferiblemente al menos 0,9 (90%); o, muy preferiblemente, al menos 0,99 (99%), tal como una semejanza de 1,0 (100%).

Las huellas digitales genéticas UNITY se pueden calcular utilizando el programa SYBYL (disponible de Tripos, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319 U.S.A.). Las huellas digitales genéticas ECFP_6 y MDL pueden calcularse utilizando el programa Pipeline Pilot (disponible de Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Die, CA 92121, USA).

Para más detalles, véase por ejemplo J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 542-549; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004, 44, 170-178; J. Med. Chem. 2004, 47, 2743-2749; J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 742-754; así como SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic Chemistry User Guide, March 2008, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008 - ambos de Accelrys Software Inc., San Diego, US, y las guías http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf, y http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf.

Un ejemplo de un cálculo de semejanza se inserta a continuación, en el que la cadena lateral entera de Chem. 23 se comparó con un éster metílico de la misma, a saber el éster mono-metílico del resto enlazador glutamina (Chem. 23a):

Chem. 23a:



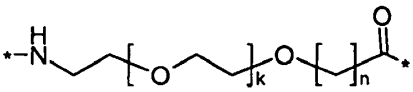
Utilizando a) huellas digitales genéticas de ECFP_6, la semejanza es 0,798, utilizando b) huellas digitales genéticas UNITY, la semejanza es 0,957; y utilizando huellas digitales genéticas MDL la semejanza es 0,905.

En el caso de dos cadenas laterales (restos de fijación de albumina) idénticas, el derivado puede designarse simétrico.

En realizaciones particulares, el coeficiente de semejanza es al menos 0,80, preferiblemente al menos 0,85, más preferiblemente al menos 0,90, aún más preferiblemente al menos 0,95 o muy preferiblemente al menos 0,99.

Cada uno de los dos enlazadores del derivado de la invención puede comprender el primer elemento enlazador siguiente:

Chem. 5:



,

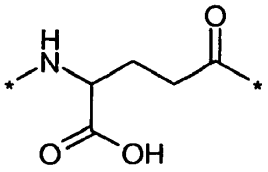
en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

En una realización particular, cuando k = 1 y n = 1, este elemento enlazador puede designarse OEG, o un dirradical de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, y/o el mismo puede representarse por la fórmula siguiente:

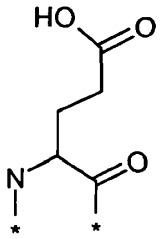
Chem. 5a: $*\text{-NH-}(CH_2)_2\text{-O-}(CH_2)_2\text{-O-}CH_2\text{-CO-}*$.

En otra realización particular, cada enlazador del derivado de la invención puede comprender adicionalmente, de modo independiente, un segundo elemento enlazador, preferiblemente un di-radical Glu, tal como Chem. 6 y/o Chem. 7:

Chem. 6:



Chem. 7:



,

en el que el di-radical Glu puede estar incluido p veces, siendo p un número entero en el intervalo de 1-3.

Chem. 6 puede designarse también como gamma-Glu, o brevemente gGlu, debido al hecho de que es el grupo gamma-carboxi del aminoácido ácido glutámico el que se utiliza aquí para conexión con otro elemento enlazador, o al grupo épsilon amino de lisina. Como se ha explicado arriba, el otro elemento enlazador puede ser, por ejemplo, otro resto Glu, o una molécula OEG. El grupo amino de Glu forma, a su vez, un enlace amida con el grupo carboxi del resto de prolongación, o con el grupo carboxi de, v.g., una molécula OEG, si está presente, o con el grupo gamma-carboxi de v.g. otro Glu, si está presente.

Chem. 7 puede designarse también como alfa-Glu, o brevemente aGlu, o simplemente Glu, debido al hecho de que es el grupo alfa-carboxi del aminoácido ácido glutámico el que se utiliza aquí para conexión con otro elemento enlazador, o al grupo épsilon-amino de lisina.

Las estructuras anteriores de Chem. 6 y Chem. 7 abarcan la forma L, así como la forma D de Glu. En realizaciones particulares, Chem. 6 y/o Chem. 7 se halla(n), independientemente, a) en la forma L, o b) en la forma D.

En otra realización particular, cada enlazador del derivado de la invención puede comprender adicionalmente, con independencia, el tercer elemento enlazador siguiente:

Chem. 8: $*\text{-NH-}(CH_2)_q\text{-}CHR^2\text{-CO-}*$,

en el que q es un número entero en el intervalo de 2-12, y R^2 es hidrógeno (H) o amino (NH_2).

En Chem. 8, el grupo $*\text{-}(CH_2)_q\text{-}*$ puede representar alquileno lineal o ramificado, preferiblemente lineal, en el que q es un número entero en el intervalo de 2-12.

En todavía otras realizaciones particulares, el enlazador tiene a) de 5 a 41 átomos C; y/o b) de 4 a 28 heteroátomos. Ejemplos particulares y no limitantes de heteroátomos son átomos N y O. Los átomos H no son heteroátomos.

Alternativamente, el resto enlazador, si está presente, tiene de 5 a 30 átomos C, preferiblemente de 5 a 25 átomos C, más preferiblemente de 5 a 20 átomos C, o muy preferiblemente de 5 a 27 átomos C. En realizaciones preferidas adicionales, el resto enlazador, si está presente, tiene de 4 a 20 heteroátomos, preferiblemente de 4 a 18 heteroátomos, más preferiblemente de 4 a 14 heteroátomos, o muy preferiblemente de 4 a 12 heteroátomos.

Alternativamente, el enlazador comprende al menos una molécula OEG, y/o al menos un residuo de ácido glutámico, o más bien los radicales correspondientes.

En una realización particular, cada enlazador está constituido por una vez Chem. 6 y dos veces Chem. 5, interconectados por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo amino

libre al grupo carbonilo libre del resto de prolongación, y en su extremo carbonilo libre al grupo épsilon-amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

En otra realización particular, cada enlazador está constituido por dos veces Chem. 5 y una vez Chem. 6, interconectados por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo amino libre al grupo carbonilo libre del resto de prolongación, y en su extremo carbonilo libre al grupo épsilon-amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

Los derivados de la invención pueden existir en formas estereoisómeras diferentes que tienen las mismas forma molecular y secuencia de átomos enlazados, difiriendo únicamente en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. La estereoisomería de los derivados citados como ejemplos de la invención se indica en la sección experimental, tanto en los nombres como en las estructuras, utilizando nomenclatura estándar. A no ser que se indique otra cosa, la invención se refiere a todas las formas estereoisómeras del derivado reivindicado.

La concentración en plasma de los derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede utilizarse LC-MS (Cromatografía Líquida-Espectroscopia de Masas), o inmunoensayos tales como RIA (Radio Inmuno-Ensayo), ELISA (Ensayo de Inmunosorbente Unido a Enzima), y LOCI (Inmunoensayo de Luminiscencia por Canalización de Oxígeno). Protocolos generales para ensayos RIA y ELISA adecuados se hallan, v.g., en WO 09/030738 en p. 116-118. Un ensayo preferido es el ensayo LOCI descrito en los Ejemplos 52, 55, y 58 de esta memoria.

Sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable

Los derivados, análogos, y productos intermedios de la invención pueden encontrarse en la forma de una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable.

Las sales se forman v.g. por una reacción química entre una base y un ácido, v.g.: $NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$.

La sal puede ser una sal básica, una sal ácida, o puede no ser ni lo uno ni lo otro (es decir una sal neutra). Las sales básicas producen iones hidróxido y las sales ácidas iones hidronio en agua.

Las sales de los derivado/s de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos que reaccionan con grupos aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos grupos pueden estar situados en el resto peptídico, y/o en la cadena lateral de los derivados de la invención.

Ejemplos no limitantes de grupos aniónicos de los derivados de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en la cadena lateral, en su caso, así como en el resto peptídico. El resto peptídico incluye a menudo un grupo ácido carboxílico libre en el término C, y puede incluir también grupos carboxílicos libres en residuos ácidos internos de aminoácidos tales como Asp y Glu.

Ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en el resto peptídico incluyen el grupo amino libre en el término N, en su caso, así como cualquier grupo amino libre de residuos básicos internos de aminoácidos tales como His, Arg, y Lys.

El éster de los derivados de la invención puede formarse, v.g., por la reacción de un grupo ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que conduce al reemplazamiento de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi.

La formación de ésteres puede implicar el grupo carboxílico libre en el término C del péptido, y/o cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral.

La amida de los derivados de la invención puede, v.g., formarse por la reacción de un grupo ácido carboxílico libre con una amina o una amina sustituida, o por reacción de un grupo amino libre o sustituido con un ácido carboxílico.

La formación de amida puede implicar el grupo carboxílico libre en el término C del péptido, cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral, el grupo amino libre en el término N del péptido, y/o cualquier grupo amino libre o sustituido del péptido en el péptido y/o la cadena lateral.

En una realización particular, el péptido o derivado se halla en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización particular, el derivado se halla en la forma de una amida farmacéuticamente aceptable, preferiblemente con un grupo amida en el término C del péptido. En otra realización particular adicional, el péptido o derivado se halla en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable.

Propiedades funcionales

En un primer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen una potencia satisfactoria. Asimismo, o alternativamente, en un segundo aspecto funcional, los mismos tienen un perfil farmacocinético prolongado. Asimismo, o alternativamente, en un tercer aspecto funcional, aquéllos son estables contra la degradación por las

enzimas gastrointestinales. Asimismo, o alternativamente, en un cuarto aspecto funcional, los mismos tienen una biodisponibilidad oral alta.

Actividad biológica (potencia)

Conforme al primer aspecto funcional, los derivados de la invención, así como los péptidos GLP-1 constituyentes como tales (tales como K^{37}-GLP-1(7-37) o análogos de los mismos), son biológicamente activos o potentes.

En una realización particular, la potencia y/o actividad se refiere a potencia in vitro, es decir eficiencia en un ensayo de receptores de GLP-1 funcional, de modo más particular a la capacidad de estimular la formación de cAMP en un linaje de células que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado.

La estimulación de la formación de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano puede determinarse preferiblemente utilizando un linaje de células transfectadas estable tal como BHK467-12A (tK-ts13), y/o utilizando para la determinación de cAMP un ensayo funcional de receptores, v.g. basado en la competición entre cAMP formado endógenamente y cAMP marcado con biotina añadido exógenamente, en cuyo ensayo cAMP se calcula más preferiblemente utilizando un anticuerpo específico, y/o en el que un ensayo aún más preferido es el Ensayo cAMP AlphaScreen, muy preferiblemente el descrito en el Ejemplo 50.

El término concentración eficaz semi-máxima (CE_{50}) se refiere generalmente a la concentración que induce una respuesta a mitad de camino entre la línea base y la máxima, por referencia a la curva de respuesta a la dosis. CE_{50} se utiliza como medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración en la que se observa el 50% de su efecto máximo.

La potencia in vitro de los derivados de la invención puede determinarse como se ha descrito arriba, y determinarse la CE_{50} del derivado en cuestión. Cuanto menor es la CE_{50}, tanto mayor es la potencia.

En una realización particular, el medio tiene la composición siguiente (concentraciones finales de ensayo): Tris-HCl 50 mM ; 5 mM HEPES; 10 mM $MgCl_2.6H_2O$; 150 mM NaCl; 0,01% Tween; 0,1% BSA; 0,5 mM IBMX; 1 mM ATP; 1 µm GTP; pH 7,4.

Un medio alternativo es: Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, $MgSO_4$ 1,5 mM, ATP 1,7 mM, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantine (IBMX) dos mM, 0,01 % Tween-20, pH 7,4.

En una realización particular adicional, el derivado de la invención tiene una CE_{50} de 3000 pM o inferior, más preferiblemente inferior a 2000 pM, aún más preferiblemente inferior a 1000 pM, o muy preferiblemente inferior a 500 pM.

En otra realización particular, los derivados de la invención son potentes in vivo, lo cual puede determinarse como es conocido en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como en pruebas clínicas.

El ratón diabético db/db es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y el efecto de disminución de glucosa en sangre puede determinarse en tales ratones in vivo, v.g. como se describe en el Ejemplo 53, o como se describe en el ejemplo 43 de WO 09/030738.

Asimismo, o alternativamente, el efecto sobre la secreción de insulina mediada por glucosa in vivo puede determinarse en estudios farmacodinámicos en lechones (IVGTT), v.g. como se describe en el Ejemplo 55.

Asimismo, o alternativamente, el efecto sobre la ingesta de alimentos in vivo puede determinarse en estudios farmacodinámicos en cerdos, v.g. como se describe en el Ejemplo 56.

Prolongación - Fijación de receptores/albúmina baja y alta

Conforme al segundo aspecto funcional, los derivados de la invención son de efecto prolongado.

La capacidad de los derivados de la invención para fijarse al receptor de GLP-1 en presencia de una concentración baja y alta de albúmina, respectivamente, puede determinarse como se describe en el Ejemplo 51.

Generalmente, la fijación al receptor de GLP-1 a concentración baja de albúmina debería ser tan satisfactoria como sea posible, correspondiendo a un valor bajo de CI_{50}.

El valor CI_{50} a concentración alta de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina sobre la fijación del derivado al receptor de GLP-1. Como es sabido, los derivados de GLP-1 se fijan también a albúmina. Éste es un efecto generalmente deseable, que prolonga su vida útil en plasma. Por tanto, el valor CI_{50} a albúmina alta será generalmente mayor que el valor CI_{50} para albúmina baja, correspondiendo a una fijación reducida al receptor de GLP-1, causada por la competición de la fijación de albúmina con la fijación al receptor de GLP-1.

Una ratio alta (valor CI_{50} (albúmina alta)/valor CI_{50} (albúmina baja)) puede tomarse por tanto como indicación de que el derivado en cuestión se fija bien a albúmina (puede tener una semivida larga), y se fija asimismo bien *per se* al receptor de GLP-1 (el valor CI_{50} (albúmina alta) es alto, y el valor CI_{50} (albúmina baja) es bajo). Por otra parte, la fijación de albúmina puede no ser siempre deseable, o la fijación a albúmina puede llegar a ser demasiado fuerte. Por tanto, los rangos deseables para CI_{50} (albúmina baja) CI_{50} (albúmina alta)/, y la ratio alta/baja pueden variar de compuesto a compuesto, dependiendo del uso propuesto y las circunstancias que rodean dicho uso, y de las propiedades de otros compuestos de interés potencial.

En una realización particular, la afinidad de fijación al receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA (albúmina baja) es inferior a 1000,00 nM, preferiblemente inferior a 600,00 nM, más preferiblemente inferior a 100,00 nM, o muy preferiblemente inferior a 50,00 nM.

Un ensayo adecuado para determinación de la fijación de receptores a concentración alta y baja de albúmina se describe en el Ejemplo 51 de esta memoria.

Prolongación - Semivida in vivo en ratas

Conforme al segundo aspecto funcional, los derivados de la invención son prolongados. En una realización particular, la prolongación puede determinarse como semivida ($T_{1/2}$) en vivo en las ratas después de administración i.v. En realizaciones adicionales, la semi-vida es al menos 4 horas, preferiblemente al menos 6 horas, aún más preferiblemente al menos 8 horas, o muy preferiblemente al menos 10 horas.

Un ensayo adecuado para determinación de la semivida in vivo en las ratas después de administración i.v. se describe en el Ejemplo 58 de esta memoria.

Prolongación - Semivida in vivo en lechones

Conforme al segundo aspecto funcional, los derivados de la invención son de efecto prolongado. En una realización particular, la prolongación puede determinarse como semivida ($T_{1/2}$) in vivo en lechones después de administración i.v. En realizaciones adicionales, la semivida es al menos 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 36 horas, aún más preferiblemente al menos 48 horas, o muy preferiblemente al menos 60 horas.

Un ensayo adecuado para determinación de la semivida in vivo en lechones después de administración i.v. se da a conocer en el ejemplo 54 de esta memoria.

Degradación por las enzimas gastrointestinales

Conforme al tercer aspecto funcional, los derivados de la invención son estables, o están estabilizados, contra la degradación por una o más enzimas gastrointestinales.

Las enzimas gastrointestinales incluyen, sin limitación, exo- y endo-peptidasas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasas, y carboxipeptidasas. La estabilidad puede testarse contra estas enzimas gastrointestinales en la forma de enzimas purificadas, o en la forma de extractos del sistema gastrointestinal.

En una realización particular, el derivado de la invención tiene una semivida in vitro ($T_{1/2}$), en un extracto de intestino delgado de rata, dividida por la semivida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37), de al menos 1, preferiblemente superior a 1,0, más preferiblemente al menos 1,2, todavía más preferiblemente al menos 2,0, aún más preferiblemente al menos 3,0, o muy preferiblemente al menos 4,0. Dicho de otro modo, una ratio (SI) puede definirse para cada derivado, a saber, como la semivida in vitro ($T_{1/2}$) de derivado en cuestión, en un extracto de intestino delgado de rata, dividida por la semivida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37).

Un ensayo adecuado para determinación de la semivida in vitro en un extracto de intestino delgado de rata se describe en el Ejemplo 57 de esta memoria.

Biodisponibilidad oral

Conforme al cuarto aspecto funcional, los derivados de la invención tienen una biodisponibilidad oral alta.

La biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 comerciales es muy baja. La biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 en desarrollo para administración i.v. o s.c.es también baja.

Conforme a ello, existe necesidad en la técnica de derivados de GLP-1 con biodisponibilidad oral mejorada. Tales derivados podrían ser candidatos adecuados para administración oral, con tal que su potencia sea generalmente satisfactoria, y/o con tal que su semivida sea también generalmente satisfactoria.

Los presentes inventores han identificado una nueva clase de derivados de GLP-1, que tienen una biodisponibilidad oral sorprendentemente alta, y al mismo tiempo una potencia, y/o semivida satisfactoria.

Asimismo, o alternativamente, estos derivados tienen una biodisponibilidad oral sorprendentemente alta, y al mismo tiempo una afinidad de fijación alta (es decir, un valor CI_{50} bajo) para el receptor de GLP-1 a concentración baja de albúmina.

Estas características son importantes con vistas a la obtención de una dosis oral diaria baja del ingrediente farmacéutico activo, lo cual es deseable por diversas razones, que incluyen, v.g., economía de producción, probabilidad de problemas de seguridad potenciales, así como problemas de comodidad de administración, y preocupaciones ambientales.

Generalmente, el término biodisponibilidad se refiere a la fracción de una dosis administrada del ingrediente farmacéutico activo (API), tal como un derivado de la invención que alcanza la circulación sistémica inalterado. Por definición, cuando se administra un API i.v., su biodisponibilidad es 100%. En cambio, cuando se administra por otras rutas (tales como la vía oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a absorción incompleta y metabolismo de primer paso). El conocimiento acerca de la biodisponibilidad es esencial cuando se calculan las dosis para rutas de administración distintas de i.v.

La biodisponibilidad oral absoluta compara la biodisponibilidad (estimada como el área bajo la curva, o AUC) del API en la circulación sistémica después de administración oral, con la biodisponibilidad del mismo API después de administración i.v. Es la fracción del API absorbida por administración no i.v. comparada con la administración i.v. correspondiente del mismo API. La comparación tiene que normalizarse para una dosis si se utilizan dosis diferentes; por consiguiente, cada AUC se corrige dividiendo la dosis administrada correspondiente.

Se construye una gráfica de concentración de API en plasma en función del tiempo después de administración oral e i.v. La biodisponibilidad absoluta (F) es la AUC oral corregida por dosis dividida por la AUC i.v.

Los derivados de la invención tienen una biodisponibilidad oral absoluta que es mayor que la de a) liraglutida, y/o b) semaglutida; preferiblemente al menos 10% mayor, más preferiblemente al menos 20% mayor, aún más preferiblemente al menos 30% mayor, o muy preferiblemente al menos 40% mayor. Antes de ensayar la biodisponibilidad oral, los derivados de la invención pueden formularse adecuadamente como es bien conocido en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulinotrópicos, v.g. utilizando una cualquiera o más de las formulaciones descritas en WO 2008/145728.

Se ha desarrollado un test, descrito en el Ejemplo 52, que se encontró es una predicción muy satisfactoria de la biodisponibilidad oral. Conforme a este test, después de inyección directa del derivado de GLP-1 en el lumen intestinal de rata, se determina la concentración (exposición) del mismo en plasma, y se calcula la ratio de concentración en plasma (pmol/l) dividida por la concentración de la solución de dosificación (µmol/l) para t = 30 min. Esta ratio es una medida de la biodisponibilidad intestinal, y se ha demostrado que se correlaciona bien con los datos de biodisponibilidad oral reales.

Realizaciones particulares adicionales de los derivados de la invención se describen en las secciones encabezadas "realizaciones particulares" y "realizaciones particulares adicionales" antes de la sección experimental.

PROCESOS DE PRODUCCIÓN

La producción de péptidos como GLP-1 (7-37) y análogos de GLP-1 es bien conocida en la técnica.

El resto GLP-1 de los derivados de la invención (o fragmentos de los mismos) tales como K^{37}-GKP-1 (7-37) o un análogo o fragmento del mismo, puede producirse por ejemplo por síntesis clásica de péptidos, v.g., síntesis de péptidos en fase sólida utilizando química de t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, véase, v.g., Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, "Organic Synthesis on Solid Phase", Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000, y "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", editado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000.

Asimismo, o alternativamente, aquéllos pueden producirse por métodos recombinantes, a saber por cultivo de una célula hospedadora que contiene una secuencia de DNA que codifica el análogo y es capaz de expresar el péptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido. Ejemplos no limitantes de células hospedadoras adecuadas para expresión de estos péptidos son: Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, así como linajes de células de mamífero BHK o CHO.

Aquellos derivados de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o un mono- o dipéptido mimético N-terminal unido covalentemente pueden producirse v.g., como se describe en la parte experimental. O véase, v.g., Hodgson et al: "The synthesis of peptides y proteins containing non-natural amino acids", Chemical Society Reviews,

vol. 33, no. 7 (2004), p. 422-430; y WO 2009/083549 A1 titulado "Preparación Semi-recombinante de Análogos de GLP-1".

Ejemplos específicos de métodos de preparación de varios derivados de la invención se incluyen en la parte experimental.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de la invención o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden prepararse como es conocido en la técnica.

El término "excipiente" se refiere en términos amplios a cualquier componente distinto del o los ingredientes terapéuticos activos. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente.

El excipiente puede servir para diversos propósitos, v.g., como portador, vehículo, diluyente, adyuvante de tabletas, y/o para mejorar la administración, y/o absorción de la sustancia activa.

La formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con diversos excipientes es conocida en la técnica, véase v.g. Remington: The Science y Practice of Pharmacy (v.g. edición 19ª (1995), y ediciones posteriores).

Ejemplos no limitantes de excipientes son disolventes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes de regulación de la tonicidad, agentes quelantes, y estabilizadores.

Ejemplos de formulaciones incluyen formulaciones líquidas, es decir formulaciones acuosas que comprenden agua. Una formulación líquida puede ser una solución, o una suspensión. Una formulación acuosa comprende típicamente al menos 50% p/p de agua, o al menos 60%, 70%, 80%, o incluso al menos 90% p/p de agua.

Alternativamente, una composición farmacéutica puede ser una formulación sólida, v.g. una composición liofilizada o secada por pulverización, que puede utilizarse como tal, o a la cual el médico o el paciente añade disolventes, y/o diluyentes antes de su utilización.

El pH en una formulación acuosa puede ser cualquiera comprendido entre pH 3 y pH 10, por ejemplo desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5; o desde aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0.

Una composición farmacéutica puede comprender un tampón. El tampón puede seleccionarse v.g. del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogeno-fosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico, y mixturas de los mismos. Una composición farmacéutica puede comprender un conservante. El conservante puede seleccionarse v.g. del grupo constituido por 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, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol), y mixturas de los mismos. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. Una composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse v.g. del grupo constituido por una sal (v.g. cloruro de sodio), un azúcar o azúcar-alcohol, un aminoácido (v.g. glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (v.g. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol)-polietilenglicol (v.g. PEG400), y mixturas de los mismos. Puede utilizarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil-almidón y carboximetilcelulosa-Na. Un azúcar-alcohol se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH y que incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una realización, el aditivo azúcar-alcohol es manitol. Una composición farmacéutica puede comprender un agente quelante. El agente quelante puede seleccionarse, v.g. de sales de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y mixturas de los mismos. Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizador. El estabilizador puede ser, v.g. uno o más inhibidores de oxidación, inhibidores de agregación, surfactantes, y/o uno o más inhibidores de proteasas. Ejemplos no limitantes de estas diversas clases de estabilizadores se dan a conocer en lo que sigue.

El término "formación de agregados" se refiere a una interacción física entre las moléculas del polipéptido que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar desfavorablemente a la actividad biológica del polipéptido, dando como resultado pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Adicionalmente, la formación de

agregados puede causar otros problemas tales como bloqueo de tuberías, membranas, o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene el polipéptido utilizando un sistema de infusión.

Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados del polipéptido durante el almacenamiento de la composición. El término "base de aminoácido" se refiere a uno o más aminoácidos (tales como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), o análogos de los mismos. Cualquier aminoácido puede estar presente sea en su forma de base libre o en su forma de sal. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mixtura de los mismos) del aminoácido base puede estar presente.

Puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácido que contienen azufre) para inhibir la oxidación de residuos metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo metionina susceptible de dicha oxidación. Puede utilizarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o combinaciones de los mismos.

Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de baja molecularidad. El estabilizador puede seleccionarse v.g. de polietilen-glicol (v.g. PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de los mismos (v.g. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y sales diferentes (v.g. cloruro de sodio). Una composición farmacéutica puede comprender agentes estabilizadores adicionales tales como, pero sin carácter limitante, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un surfactante no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con congelación-descongelación o cizallamiento mecánico.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más surfactantes, preferiblemente un surfactante, al menos un surfactante, o dos surfactantes diferentes. El término "surfactante" se refiere a cualesquiera moléculas o iones que están constituidos por una parte soluble en agua (parte hidrófila), y una parte soluble en grasas (lipófila). El surfactante puede seleccionarse v.g. del grupo constituido por surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes no iónicos, y/o surfactantes híbridos.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más inhibidores de proteasas, tales como, v.g., EDTA (ácido etilenodiamina-tetraacético), y/o benzamidina.HCl.

Ingredientes adicionales, opcionales, de una composición farmacéutica incluyen, v.g. agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de aumento de volumen, iones metálicos, vehículos aceitosos, proteínas,

(v.g., seroalbúmina humana, gelatina), y/o un ion híbrido (v.g., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).

Todavía adicionalmente, una composición farmacéutica puede formularse como es conocido en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulinotrópicos, v.g., utilizando una cualquiera o más de las formulaciones descritas en WO 2008/145728.

Una dosis administrada puede contener desde 0,01 mg a 100 mg del derivado, o desde 0,01-50 mg, o desde 0,01-20 mg, o desde 0,01-10 mg del derivado.

El derivado puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica. El mismo puede administrarse a un paciente que se halla en necesidad de ello en diversos sitios, por ejemplo, en sitios tópicos tales como sitios de la piel o de las mucosas; en sitios que puentean la absorción tales como en una arteria, en una vena, o en el corazón; y en sitios que implican absorción, tales como en la piel, bajo la piel, en un músculo, o en el abdomen.

La ruta de administración puede ser, por ejemplo, lingual; sublingual; bucal; en la boca; oral; en el estómago; en el intestino; nasal; pulmonar, tal como a través de los bronquiolos, los alvéolos, o una combinación de los mismos; parenteral; epidérmica; dérmica; transdérmica; conjuntiva; uretral; vaginal; rectal; y/u ocular. Una composición puede encontrarse en forma de una composición oral, y la ruta de administración es a través de la boca.

Una composición puede administrarse en varias formas de dosificación. por ejemplo, como una solución; una suspensión; una emulsión; una microemulsión; emulsiones múltiples; una espuma; una pomada; una pasta; una tirita; un ungüento; una tableta; una tableta recubierta; una goma de mascar; un enjuagado; una cápsula tal como cápsulas de gelatina dura o blanda; un supositorio; una cápsula rectal; gotas; un gel; una pulverización; un polvo; un aerosol; un inhalante; gotas oftálmicas; un ungüento oftálmico; un enjuagado oftálmico; un pesario vaginal; un anillo vaginal; un ungüento vaginal; una solución de inyección; y una solución de transformación in situ tal como gelificación in situ, fijación, precipitación, y cristalización in situ; una solución de infusión; o como un implante. La composición puede ser una tableta, opcionalmente recubierta, una cápsula, o una goma de mascar.

Una composición puede componerse ulteriormente en un portador de fármaco o sistema de suministro de fármaco, v.g. a fin de mejorar la estabilidad, biodisponibilidad, y/o solubilidad. En una realización particular, una composición puede estar unida a dicho sistema por interacciones covalentes, hidrófobas y/o electrostáticas. El propósito de dicha composición puede ser, v.g., reducir los efectos adversos, conseguir cronoterapia, y/o aumentar la aceptación por el paciente.

Una composición puede utilizarse también en la formulación de sistemas de suministro de fármaco de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada, y/o lenta.

La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o i.v. por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla tipo pluma, o por medio de una bomba de infusión.

Una composición puede administrarse por vía nasal en la forma de una solución, suspensión, o un polvo; o puede administrarse por vía pulmonar en la forma de un líquido o en forma de polvo.

La administración transdérmica es otra opción adicional, v.g., por inyección sin aguja, a partir de un parche tal como un parche iontoforético, o por una ruta transmucosal, v.g. bucalmente.

Una composición puede ser una formulación estabilizada. El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física y/o química incrementada, preferiblemente ambas. En general, una formulación tiene que ser estable durante el uso y el almacenamiento (en cumplimiento con condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que se alcanza la fecha de expiración.

El término "estabilidad física" se refiere a la tendencia del polipéptido a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de la exposición a estrés termomecánico, y/o interacción con interfaces y superficies desestabilizadoras (tales como superficies hidrófobas). La estabilidad física de una formulación acuosa de polipéptido puede evaluarse por medio de inspección visual, y/o por medidas de turbidez después de exposición a estrés mecánico/físico (v.g. agitación) a diferentes temperaturas durante diversos periodos de tiempo. Alternativamente, la estabilidad física puede evaluarse utilizando un agente espectroscópico o sonda del estatus de conformación del polipéptido tal como v.g. Tioflavina T o sondas de “parche hidrófobo".

El término "estabilidad química" se refiere a cambios químicos (en particular, covalentes) en la estructura del polipéptido que conducen a la formación de productos químicos de degradación que tienen potencialmente una potencia biológica reducida, y/o efecto inmunógeno incrementado comparado con el polipéptido intacto. La estabilidad química puede evaluarse por medida de la cantidad de productos químicos de degradación en diversos momentos después de exposición a diferentes condiciones ambientales, v.g., por SEC-HPLC, y/o RP-HPLC.

El tratamiento con un derivado conforme a la presente invención puede combinarse también con una o más sustancias adicionales farmacológicamente activas, v.g. seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes de regulación del apetito, agentes anti-hipertensivos, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociadas con obesidad. Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: insulina, 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 glicogenólisis, moduladores de la absorción de glucosa, compuestos modificadores del metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos tales como inhibidores de HMG CoA (estatinas), Polipéptidos Inhibidores Gástricos (análogos GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos (agonistas RXP y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β; colestiramida, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, provocol, dextrotirosina, negletinida, repaglinida; β-bloqueadores tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol; inhibidores de la ACE (enzima convertidora de las angiotensinas) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, ditiazem y verapamil, y α-bloqueadores tales como doxazosina, urapidil, prazosín y terazosín; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína-anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de PYY, agonistas del receptor Y2, agonistas del receptor Y4, agonistas del receptor mixto Y2/Y4, agonistas de MC4 (melanocortina-4), antagonistas de orexina, agonistas del DMF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de fijación del factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas β3, oxintomodulina y análogos, agonistas de MSH (hormona estimulante de los melanocitos), antagonistas de MCH (hormona de concentración de melanocitos), agonistas CCK (colecistoquinina), inhibidores de la reabsorción de serotonina, inhibidores de la reabsorción de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, 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 tirotropina), moduladores de UCP dos ó 3 (proteína desacopladora dos ó 3), agonistas de leptina, agonistas DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amidasa, moduladores RXR (receptor del retinoide X), agonistas TR β, antagonistas

H3 de histamina, agonistas o antagonistas del Polipéptido Inhibidor Gástrico (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina.

El tratamiento con un derivado conforme a esta invención puede combinarse también con una cirugía que influye en los niveles de glucosa, y/u homeostasis de lípidos tal como aplicación de banda gástrica o puenteo gástrico.

INDICACIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención se refiere también a un derivado de la invención, para uso como medicamento.

En realizaciones particulares, el derivado de la invención puede utilizarse para los tratamientos médicos siguientes, relacionados todos ellos preferiblemente de un modo u otro con la diabetes:

(i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes tales como hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia deteriorada a la glucosa, diabetes tipo 1, diabetes no dependiente de insulina, MODY (diabetes de los jóvenes al comienzo en la madurez), diabetes de la gestación, para reducción de HbA1C;

(ii) retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética, tal como progresión en la diabetes tipo 2, retardo de la progresión de la tolerancia deteriorada a la glucosa (IGT) a diabetes tipo dos que requiere insulina, y/o retardo de la progresión de la diabetes tipo dos que no requiere insulina a diabetes tipo dos que requiere insulina;

(iii) mejora de la función de las células β, tal como disminución de la apoptosis de las células β, aumento de la función de las células β y/o masa de células β, y/o para restaurar la sensibilidad de la glucosa a las células β;

(iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos;

(v) prevención y/o tratamiento de trastornos de la comida, tales como obesidad, v.g. por disminución la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, induciendo saciedad; tratamiento o prevención de trastornos por excesos en la comida, bulimia nerviosa, y/u obesidad inducida por administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la motilidad gástrica; y/o retardo del vaciado gástrico;

(vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como neuropatía, con inclusión de neuropatía periférica; nefropatía; o retinopatía;

(vii) mejora de los parámetros de lípidos, tales como prevención y/o tratamiento de la dislipidemia, disminución de lípidos totales en suero; disminución de HDL; disminución de LDL pequeño denso; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; disminución de colesterol; aumento de HDL; disminución de los niveles de lipoproteína a en plasma (Lp(a)) en un humano; inhibición de la generación de apolipoproteína a (apo(a)) in vitro y/o in vivo;

(iix) prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X; ateroesclerosis; infarto de miocardio; enfermedad cardiaca coronaria; ictus, isquemia cerebral; una enfermedad cardiaca temprana o cardiovascular temprana, tal como hipertrofia ventricular izquierda; enfermedad de arteria coronaria; hipertensión esencial; urgencia hipertensiva aguda; cardiomiopatía; insuficiencia cardiaca; tolerancia al ejercicio; fallo cardiaco crónico; arritmia; disritmia cardiaca; síncope; ateroesclerosis; insuficiencia cardiaca crónica leve; angina de pecho; reoclusión de puenteo cardiaco; claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterante); disfunción diastólica; y/o disfunción sistólica;

(ix) prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como de síndrome inflamatorio intestinal; síndrome del intestino delgado, o enfermedad de Crohn; dispepsia; y/o ulceras gástricas;

(x) prevención y/o tratamiento de enfermedad grave, tal como tratamiento de un paciente gravemente enfermo, un paciente de polinefropatía por enfermedad grave (CIPNP), y/o paciente potencial por CIPNP; prevención de enfermedad grave o desarrollo de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; y/o para la prevención o reducción de la probabilidad de que un paciente sufra bacteremia, septicemia, y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o

(xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS).

En una realización particular, la indicación se selecciona del grupo constituido por (i)-(iii) y (v)-(iix), tal como las indicaciones (i), (ii), y/o (iii); o indicación (v), indicación (vi), indicación (vii), y/o indicación (iix).

En otra realización particular, la indicación es (i). En una realización particular adicional, la indicación es (v). En otra realización particular adicional, la indicación es (iix).

Las indicaciones siguientes son particularmente preferidas: diabetes tipo 2, y/u obesidad.

REALIZACIONES PARTICULARES

Las siguientes son realizaciones particulares relacionadas con la invención:

1. Un derivado de un análogo de GLP-1,
análogo que comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y un máximo de

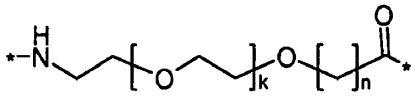
10 modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26},
derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación seleccionado de Chem. 1, Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 1: $HOOC-(CH_2)_x-CO-*$
Chem. 2: $HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$
Chem. 3: $R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$
Chem. 4: $HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

en los cuales x es un número entero en el intervalo de 6-18, y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da, y w es un número entero en el intervalo de 6-18;

con la salvedad de que cuando el resto de prolongación es Chem. 1, el resto de fijación de albúmina comprende adicionalmente un enlazador de fórmula Chem. 5:

Chem. 5:

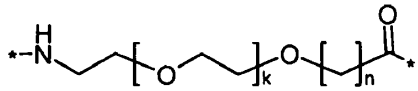


en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5;
o una sal, amida, o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.
2. El derivado de la realización 1,
en el que el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y a menudo un número máximo de modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26},
derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación seleccionado de Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 2: $HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$
Chem. 3: $R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$
Chem. 4: $HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

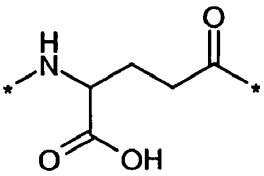
en los cuales y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da, y w es un número entero en el intervalo de 6-18;
o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.
3. El derivado de la realización 2, en el que el resto de fijación de albúmina comprende adicionalmente un enlazador.
4. El derivado de la realización 3, en el que el enlazador comprende i) un di-radical Glu y/o ii) un enlazador de fórmula Chem. 5.

Chem. 5:

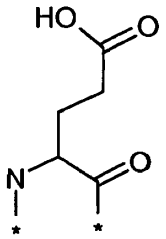


en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.
5. El derivado de la realización 4, en el que el di-radical Glu se selecciona de Chem. 6, y/o Chem. 7:

Chem. 6:



Chem. 7:



;

preferiblemente Chem. 6.

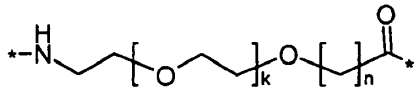
6. El derivado de la realización 1,
en el que el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y un máximo de 10 modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26},
derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende

i) un resto de prolongación de fórmula Chem. 1

Chem. 1: $HOOC-(CH_2)_x-CO-*$

en la cual x es un número entero en el intervalo de 6-18; y
ii) un enlazador de fórmula Chem. 5:

Chem. 5:



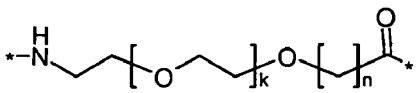
en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5; o una sal, amida, o éster del mismo farmacéuticamente aceptable.

7. El derivado de la realización 1,
en el que el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), y un máximo de 10 modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), en el que el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26},
derivado que comprende dos restos de prolongación unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, por un enlazador, en el que el resto de prolongación se selecciona de Chem. 1, Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 1: $HOOC-(CH_2)_x-CO-*$
Chem. 2: $HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$
Chem. 3: $R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$
Chem. 4: $HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

en las cuales x es un número entero en el intervalo de 6-18, y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 DA, y w es un número entero en el intervalo de 6-18; y
el enlazador comprende Chem. 5:

Chem. 5:



en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

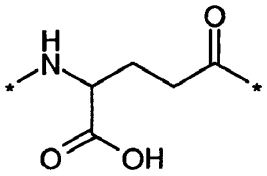
8. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que Chem. 5 es un primer elemento enlazador.

9. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que k es 1.

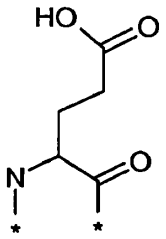
10. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-9, en el que n es 1.

11. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-10, en el que Chem. 5 se incluye m veces, en el que m es un número entero en el intervalo de 1-10.
12. El derivado de la realización 11, en el que m es un número entero en el intervalo de 1-6; preferiblemente en el intervalo de 1-4; más preferiblemente m es 1 ó 2; o muy preferiblemente m es 2.
13. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 11-12, en el que, cuando m es diferente de 1, los elementos de Chem. 5 están interconectados por uno o más enlaces amida.
14. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-13, en el que el enlazador está constituido por uno o más elementos Chem. 5.
15. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-13, en el que el enlazador comprende adicionalmente un segundo elemento enlazador; preferiblemente un di-radical Glu; más preferiblemente seleccionado de Chem. 6, y/o Chem. 7:

Chem. 6:



Chem. 7:



;

muy preferiblemente Chem. 6.
16. El derivado de la realización 15, en el que el di-radical Glu se incluye p veces, en el que p es un número entero en el intervalo de 1-3.
17. El derivado de la realización 16, en el que p es 1, 2, ó 3; preferiblemente 1 ó 2; o muy preferiblemente 1.
18. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-17, en el que el di-radical Glu es un radical de L-Glu o D-gGlu, preferiblemente de L-Glu.
19. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 16-18, en el que los uno o más di-radicales Glu y los uno o más elementos Chem. 5 están interconectados por uno o más enlaces amida.
20. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-19, en el que el enlazador comprende un elemento enlazador adicional, tal como un tercer elemento enlazador.
21. El derivado de la realización 20, en el que el tercer elemento enlazador es

Chem. 8: $*\text{-NH-}(CH_2)_q\text{-}CHR^2\text{-CO-}*$,

en el que q es un número entero en el intervalo de 2-12, y R^2 es hidrógeno (H), amino (NH_2), o un alcohol inferior C1-C5.
22. El derivado de la realización 21, en el que q es 4, 6, ó 10.
23. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 21-22, en el que Chem. 8 es un radical de ácido amino-hexanoico, ácido amino-octanoico, ácido amino-dodecanoico, o lisina.
24. El derivado de la realización 23, en el que el grupo amino radicalizado se halla en posición épsilon.
25. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-24, en el que el enlazador está constituido por m veces Chem. 5 y p veces el di-radical Glu.
26. El derivado de la realización 25, en el que (m, p) es (2,2), (2,1), (2,3), (4,1), (6,1), (1,0), (1,1), (1,2), (0,1), o (0,2); preferiblemente (2,1), (2,0), (1,0), (1,1), (0,1), o (0,2); más preferiblemente (2,1), (2,2), o (1,2); aún más preferiblemente (1,1) o (2,1); o muy preferiblemente (2,1).
27. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 25-26, en el que los m elementos Chem. 5 y los p di-radicales Glu están interconectados por enlaces amida.
28. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 21-24, en el que el enlazador está constituido por m veces Chem. 5, p veces el di-radical Glu, y Chem. 8.
29. El derivado de la realización 28, en el que (m, p) es (2,1), o (1,1); preferiblemente (2,1).
30. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 28-29, en el que los m elementos Chem. 5, los p di-radicales Glu, y el elemento Chem. 8 están interconectados por enlaces amida.

31. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-30, en el que el enlazador y el resto de prolongación están interconectados por un enlace amida.
32. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-31, en el que el enlazador y el análogo de GLP-1 están interconectados por un enlace amida.33. El derivado de la realización 32, en el que el enlazador está unido al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37}.
34. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-33, en el que el enlazador tiene
(i) de 5 a 41 átomos C; preferiblemente 5-17 átomos C; tal como 5, 6, 11, 12, ó 17 átomos C; por ejemplo 5, 6 ó 12 átomos C, o 11 ó 17 átomos C; o muy preferiblemente 17 átomos C; o
(ii) de 5 a 30 átomos C, preferiblemente 5-25 átomos C, más preferiblemente 5-20 átomos C, o muy preferiblemente de 5 a 17 átomos C.
35. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-34, en el que el enlazador tiene:
(i) de 4 a 28 heteroátomos; preferiblemente de 4 a 12 heteroátomos; tal como 4, 8, ó 12 heteroátomos; más preferiblemente 8 ó 12 heteroátomos; o muy preferiblemente 12 heteroátomos; o
(ii) de 4 a 20 heteroátomos, preferiblemente de 4 a 18 heteroátomos, más preferiblemente de 4 a 14 heteroátomos, o muy preferiblemente de 4 a 12 heteroátomos.
36. El derivado de la realización 35, en el que los heteroátomos son átomos N y/o átomos O.
37. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 34-36, en el que el enlazador tiene de 1 a 7 átomos N; preferiblemente de 1 a 3 átomos N; tal como 1, 2, ó 3 átomos N; por ejemplo 1 ó dos átomos N, o muy preferiblemente 3 átomos N.
38. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 34-37, en el que el enlazador tiene de 3 a 21 átomos O; preferiblemente de 3 a 9 átomos O; tal como 3, 6, ó 9 átomos O; por ejemplo 3, ó 6 átomos O; o muy preferiblemente 9 átomos O.
39. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por dos veces Chem. 5, interconectadas por un enlace amida, y que están conectadas en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
40. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por cuatro veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida, y conectadas en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
41. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por dos veces Chem. 6 y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
42. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por dos veces Chem. 5 y una vez Chem. 6, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO libre al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
43. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por tres veces Chem. 6 y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO libre al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
44. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6 y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO libre al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
45. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, una vez Chem. 5, y una vez Chem. 6, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
46. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, y cuatro veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
47. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, y seis veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
48. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, y una vez Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
49. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 5, una vez Chem. 6, y una vez Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.
50. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 7, y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el

enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

51. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 5, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

52. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

53. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-38, en el que el enlazador está constituido por dos veces Chem. 6, interconectadas por enlaces amida, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

54. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-53, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, una vez Chem. 8, en las cuales preferiblemente q es 10 y R^2 es H, una vez Chem. 6, y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

55. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-54, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, una vez Chem. 8, en las cuales preferiblemente q es 4 y R^2 es H, una vez Chem. 6, y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

56. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-55, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, una vez Chem. 8, en las cuales preferiblemente q es 6 y R^2 es H, una vez Chem. 6, y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

57. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 15-18, en el que el enlazador está constituido por una vez Chem. 6, una vez Chem. 8, en las cuales preferiblemente q es 4 y R^2 es NH_2, una vez Chem. 6, y dos veces Chem. 5, interconectadas por enlaces amida y en la secuencia indicada, estando conectado el enlazador en su extremo *-NH al extremo *-CO del resto de prolongación, y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{26} o K^{37} del análogo de GLP-1.

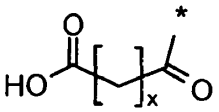
58. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-57, en el que el resto de prolongación es Chem. 1.

59. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-58, en el que x es un número par.

60. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-59, en el que x es un número entero en el intervalo de 8-16, tal como 8, 10, 12, 14, ó 16; o preferiblemente en el intervalo de 10-14.

61. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-60, en el que x es 10, 12, ó 14; preferiblemente 14, más preferiblemente 10; o muy preferiblemente 12.

62. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-61, en el que Chem. 1 se representa por Chem. 1a:

Chem. 1a: 

,

en el que x es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-61.

63. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-57, en el que el resto de prolongación es Chem. 2.

64. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-63, en el que y es un número impar.

65. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-64, en el que y es un número entero en el intervalo de 7-17; tal como 7, 9, 11, 13, 15, ó 17; preferiblemente 7-15, tal como, por ejemplo 9, 11 ó 15.

66. El derivado de una cualquiera de las realizaciones de las realizaciones 1-65, en el que y es 7, 8, 9, 11, ó 15.

67. El derivado de una cualquiera de las realizaciones de las realizaciones 1-65, en el que y es 7, 9, 11, ó 15.

68. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-67, en el que y es 7.

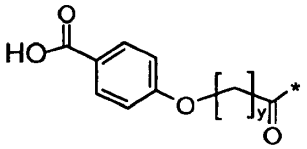
69. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-68, en el que y es 9.

70. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-69, en el que y es 11.

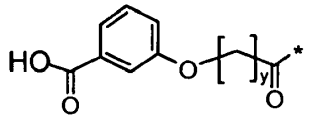
71. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-70, en el que y es 15.

72. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-71, en el que Chem. 2 se representa por Chem. 2a, o Chem. 2b:

Chem. 2a:



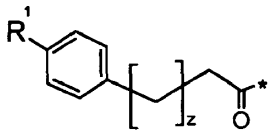
Chem. 2b:



;

preferiblemente por Chem. 2a;
en el que y es como se define en cualquiera de las realizaciones 1-71.
73. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-57, en el que el resto de prolongación es Chem. 3.
74. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-73, en el que z es un número impar, preferiblemente 3.
75. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-74, en el que R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 127 Da.
76. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-75, en el que R^1 es un grupo que tiene una masa molar en el intervalo de 1-127 Da; preferiblemente 1-125 Da, más preferiblemente 1-100 Da, aún más preferiblemente 1-75 Da, o muy preferiblemente 1-50 Da.
77. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-76, en el que R^1 es un grupo que tiene
(ii) una masa molar inferior a 130 Da, preferiblemente inferior a 100 Da, más preferiblemente inferior a 75 Da, aún más preferiblemente inferior a 60 Da, o muy preferiblemente inferior a 50 Da; o
(iii) una masa molar inferior a 40 Da, preferiblemente inferior a 30 Da, más preferiblemente inferior a 20 Da, o muy preferiblemente inferior a 15 Da.
78. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-77, en el que R^1 es H.
79. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-78, en el que R^1 es un radical halógeno.
80. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-79, en el que R^1 es -I.
81. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-80, en el que R^1 es alquilo C1-C5 lineal o ramificado; preferiblemente alquilo C1-C4; más preferiblemente metilo; o muy preferiblemente terc-butilo.
82. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-81, en el que Chem. 3 se representa por Chem. 3a:

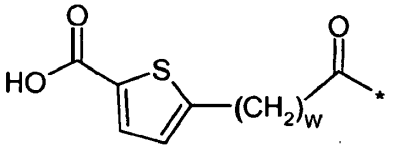
Chem. 3a:



;

en el que R^1 y z son como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-81.
83. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-57, en el que el resto de prolongación es Chem. 4.
84. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-83, en el que w es un número par.
85. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-84, en el que w es un número entero en el intervalo de 8-16; o preferiblemente en el intervalo de 10-14.
86. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-85, en el que w es 10, 12, ó 14; preferiblemente 14; más preferiblemente 10; o muy preferiblemente 12.
87. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-86, en el que Chem. 4 se representa por Chem. 4a:

Chem. 4a:



.

en el que w es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-86.
88. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-87, en el que los dos restos de prolongación son sustancialmente idénticos; tales como al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idénticos.
89. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-88, en el que los dos restos de prolongación tienen una semejanza de al menos 0,5; preferiblemente al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,7, o al menos 0,8; aún más preferiblemente al menos 0,9; o muy preferiblemente al menos 0,99, tal como una semejanza de 1,0.
90. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-89, en el que los dos enlazadores son sustancialmente idénticos; tales como al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idénticos.
91. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-90, en el que los dos enlazadores tienen una semejanza de al menos 0,5; preferiblemente al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,7, o al menos 0,8; aún más preferiblemente al menos 0,9; o muy preferiblemente al menos 0,99, tal como una semejanza de 1,0.

92. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-91, en el que los dos fijadores de albúmina, tales como las dos cadenas laterales constituidas por resto de prolongación y enlazador, son sustancialmente idénticos; tal como al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idénticos.

93. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-92, en el que los dos fijadores de albúmina, tales como las dos cadenas laterales constituidas por resto de prolongación y enlazador, tienen una semejanza de al menos 0,5; preferiblemente al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,7, o al menos 0,8; aún más preferiblemente al menos 0,9; o muy preferiblemente al menos 0,99, tal como una semejanza de 1,0.

94. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 88-93, en el que las dos estructuras químicas a comparar están representadas como huellas digitales genéticas, tales como a) huellas digitales genéticas ECFP_6; b) huellas digitales genéticas UNITY; y/o c) huellas digitales genéticas MDL; y en el que para cada uno de a), b) y c) se utiliza preferiblemente el coeficiente de Tanimoto para el cálculo de la semejanza, o identidad, de las dos huellas digitales genéticas.

95. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-94, en el que

a) las porciones correspondientes a la posición 37 y 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), y/o

b) el número de modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1),

se identifican por escritura a mano y observación visual.

96. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-95, en el que

a) las posiciones correspondientes a la posición 37 y 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), y/o

b) el número de modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1),

se identifican por el uso de un programa de alineación estándar de proteínas o péptidos.

97. El derivado de la realización 96, en el que el programa de alineación es una alineación Needleman-Wunsch.

98. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 96-97, en el que se utilizan la matriz de registro por defecto y la matriz de identidad por defecto.

99. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 96-98, en el que la matriz de registro es BLOSUM62.

100. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 96-99, en el que la penalidad por el primer residuo en una laguna es -10 (menos diez).

101. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 96-100, en el que las penalidades por residuos adicionales en una laguna son -0,5 (menos cero coma cinco).

102. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-101, en el que el análogo no comprende residuo k alguno distinto del primero y el segundo residuos K.

103. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-102, en el que la o las modificaciones está/están en una o más posiciones correspondientes a las posiciones siguientes en GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1): 7, 8, 9, 23, 30, 31, 34, 36, 37, y 38.

104. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-103, en el que el análogo comprende, preferiblemente tiene, un mínimo de dos modificaciones de aminoácido, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1); estando localizadas preferiblemente como mínimo las dos modificaciones de aminoácido en cada una de las posiciones correspondientes a las posiciones 34 y 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), y más preferiblemente de tal manera que el aminoácido en posición correspondiente a la posición 37 es K, y el aminoácido en posición correspondiente a la posición 34 es distinto de K.

105. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-104, en el que el análogo de GLP-1 tiene una amida C-terminal.

106. El derivado de la realización 105, en el que el aminoácido en posición correspondiente a la posición 34 es R o Q.

107. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-106, en el que las modificaciones de aminoácido se seleccionan de las siguientes: (R^{34} o Q^{34}), K^{37}, (Des^7 o Imp^7), (D-Ala^8, Des^8, Aib^8, G^8, o S^8), (Q^9 o G^9), R^{23}, E^{30}, H^{31}, G^{36}, y/o (E38 o G^{38}).

108. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-107, en el que las modificaciones de aminoácido se seleccionan de las siguientes: (R^{34} o Q^{34}), K^{37}, (Des^7 o Imp^7), (Des^8 o Aib^8), (Q^9 o G^9), R^{23}, E^{30}, H^{31}, G^{36}, y/o (E^{38} o G^{38}).

109. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-108, en el que el análogo comprende (R^{34} o Q^{34}), y K^{37}.

110. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-109, en el que el análogo comprende Imp^7, y/o (Aib^8 o S^8); preferiblemente Imp^7, y/o Aib^8; más preferiblemente Imp^7; o muy preferiblemente Aib^8.

111. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-110, en el que el análogo comprende G^{38} o E^{38}, preferiblemente E^{38}.

112. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-111, en el que el análogo comprende Q^9 o G^9.

113. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-112, en el que el análogo comprende G^{36}.

114. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-113, en el que el análogo comprende H^{31}.

115. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-114, en el que el análogo comprende R^{23}.

116. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-115, en el que el análogo comprende des^7 y/o des^8, preferiblemente ambos.

117. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-116, en el que un aminoácido ha sido delecionado en una posición correspondiente a la posición 7 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

118. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-117, en el que un aminoácido ha sido delecionado en una posición correspondiente a la posición 8 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

119. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-118, en el que han sido delecionados dos aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición 7 y 8 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

120. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-119, que es un análogo de GLP-1 (8-37) (aminoácidos 2-31 de SEQ ID NO: 1), que tiene hasta diez, nueve, ocho, o seis modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

121. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-120, que es un análogo de GLP-1 (9-37) (aminoácidos 3-31, respectivamente, de SEQ ID NO: 1), que tiene hasta diez, nueve, ocho, o seis modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

122. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-121, en el que el análogo de GLP-1 corresponde a (a) K^{37}-GLP-1 (7-37), (b) K^{37}-GLP-1 (8-37), (c) K^{37}-GLP-1 (9-37), o (d) un análogo de uno cualquiera de (a)-(c) que tiene hasta diez, nueve, ocho, o seis modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

123. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-122, en el que un mimético de His distinto de His se halla en una posición correspondiente a la posición dos de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

124. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-123, en el que un mimético de His-Ala distinto de His-Ala se halla en las posiciones correspondientes a la posición 7 y 8 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).

125. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 123-124, en el que el mimético de His, o el mimético de His-Ala, comprenden a) imidazol; o b) piridina.

126. El derivado de la realización 125, en el que el imidazol es un derivado de un imidazol que comprende un extremo *-CO, para acoplamiento covalente a *-NH del aminoácido N-terminal del análogo, por formación de un enlace amida.

127. El derivado de la realización 125, en el que la piridina es un derivado de piridina que comprende un extremo *-CO, para acoplamiento covalente a *-NH del aminoácido N-terminal del análogo, por formación de un enlace amida.

128. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-127, en el que el derivado de imidazol está mono-sustituido.

129. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-127, en el que el derivado de piridina está mono-sustituido.

130. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-129, en el que el derivado de imidazol está sustituido con un grupo que comprende un radical de ácido carboxílico de un alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

131. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-129, en el que el derivado de piridina está sustituido con un grupo que comprende un radical de ácido carboxílico de un alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

132. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 130-131, en el que el radical de ácido carboxílico se selecciona de acetilo; y propionilo, butirilo, pentanoílo lineales o ramificados; preferiblemente acetilo.

133. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-132, en el que el residuo de aminoácido en posición correspondiente a la posición 8 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) tiene 3H-imidazol-4-il-acetilo unido a su átomo N.

134. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-133, en el que el residuo de aminoácido en posición correspondiente a la posición 8 de SEQ ID NO: 1 es alanina.

135. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-134, en el que el imidazol está sustituido con (metilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (propilcarbamoil)-2-metil-propionilo, o (butilcarbamoil)-2-metil-propionilo; preferiblemente con (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo.

136. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-135, en el que el residuo de aminoácido en posición correspondiente a la posición 9 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) tiene {2-[2-(1H-imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metil-propionilo} unido a su átomo N.

137. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 125-136, en el que la piridina está sustituida con (metilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (propilcarbamoil)-2-metil-propionilo, o (butilcarbamoil)-2-metil-propionilo; preferiblemente con (metilcarbamoil)-2-metil-propionilo.

138. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-137, en el que el residuo del aminoácido en posición correspondiente a la posición 9 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) tiene [2,2-dimetil-3-oxo-3-(piridin-2-ilmetilamino)propanoílo] unido a su átomo N.

139. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-138, en el que el residuo de aminoácido en posición correspondiente a la posición 9 del análogo de GLP-1 es ácido glutámico.

140. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-139, en el que el análogo no comprende (H^{31} y Q^{34}).

141. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-140, en el que el análogo no comprende (des^7 y des^8); y/o no comprende un mimético de His, o un mimético de His-Ala como se define en una cualquiera de las realizaciones 116-140.

142. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-141, en el que el análogo es un análogo de GLP-1 (7-37) o GLP-1 (9-37).

143. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-142, en el que el análogo comprende, preferiblemente tiene, los cambios de aminoácido, o modificaciones siguientes, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1): i) (34R, 37K); ii) (8Aib, 34R, 37K); iii) (31H, 34Q, 37K); iv) (des7, des8, 34R, 37K), y opcionalmente (38E); o iv) (34R, 36G, 37K).

144. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-143, en el que el análogo tiene un máximo de nueve modificaciones de aminoácido.

145. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-144, en el que el análogo tiene un máximo de ocho modificaciones de aminoácido.

146. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-145, en el que el análogo tiene un máximo de siete modificaciones de aminoácido.

147. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-146, en el que el análogo tiene un máximo de seis modificaciones de aminoácido.

148. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-147, en el que el análogo tiene un máximo de cinco modificaciones de aminoácido.
149. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-148, en el que el análogo tiene un máximo de cuatro modificaciones de aminoácido.
150. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-149, en el que el análogo tiene un máximo de tres modificaciones de aminoácido.
151. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-150, en el que el análogo tiene un máximo de dos modificaciones de aminoácido.
152. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-151, en el que el análogo tiene un mínimo de dos modificaciones de aminoácido.
153. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-152, en el que el análogo tiene un mínimo de tres modificaciones de aminoácido.
154. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-153, en el que el análogo tiene un mínimo de cuatro modificaciones de aminoácido.
155. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-154, en el que el análogo tiene un mínimo de cinco modificaciones de aminoácido.
156. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-155, en el que el análogo tiene un mínimo de seis modificaciones de aminoácido.
157. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-156, en el que el análogo tiene un mínimo de siete modificaciones de aminoácido.
158. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-157, en el que el análogo tiene un mínimo de ocho modificaciones de aminoácido.
159. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-158, en el que el análogo tiene un mínimo de nueve modificaciones de aminoácido.
160. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-159, en el que el análogo tiene un mínimo de diez modificaciones de aminoácido.
161. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-160, en el que el análogo tiene una sola modificación de aminoácido.
162. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-161, en el que el análogo tiene dos modificaciones de aminoácido.
163. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-162, en el que el análogo tiene tres modificaciones de aminoácido.
164. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-163, en el que el análogo tiene cuatro modificaciones de aminoácido.
165. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-164, en el que el análogo tiene cinco modificaciones de aminoácido.
166. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-165, en el que el análogo tiene seis modificaciones de aminoácido.
167. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-166, en el que el análogo tiene siete modificaciones de aminoácido.
168. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-167, en el que el análogo tiene ocho modificaciones de aminoácido.
169. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-169, en el que el análogo tiene nueve modificaciones de aminoácido.
170. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-170, en el que el análogo tiene diez modificaciones de aminoácido.
171. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-171, en el que las modificaciones son, independientemente, sustituciones, adiciones, y/o deleciones.
172. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-172, en el que las modificaciones son sustituciones.
173. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-173, en el que las modificaciones son deleciones.
174. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-172, en el que las modificaciones son adiciones.
175. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-174, en el que

a) la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), y/o

b) el número de modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)

se identifica(n) por escritura manual y observación visual.
176. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-175, en el que

a) la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), y/o

b) el número de modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1)

se identifica(n) como se describe en una cualquiera de las realizaciones 96-101.
177. Un compuesto seleccionado de los siguientes: Chem. 20, Chem. 21, Chem. 22, Chem. 23, Chem. 24, Chem. 25, Chem. 26, Chem. 27, Chem. 28, Chem. 29, Chem. 30, Chem. 31, Chem. 32, Chem. 33, Chem. 34, Chem. 35, Chem. 36, Chem. 37, Chem. 38, Chem. 39, Chem. 40, Chem. 41, Chem. 42, Chem. 43, Chem. 44, Chem. 45, Chem. 46, Chem. 47, Chem. 48, Chem. 49, Chem. 50, Chem. 51, Chem. 52, Chem. 53, Chem. 54, Chem. 55, Chem. 56, Chem. 57, Chem. 58, Chem. 59, Chem. 60, Chem. 61, Chem. 62, Chem. 63, Chem. 64, Chem. 65, Chem. 66, Chem. 67, y Chem. 68; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

178. Un compuesto caracterizado por su nombre, y seleccionado de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-49 de esta memoria, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

179. El compuesto de la realización 178, que es un compuesto de la realización 177.

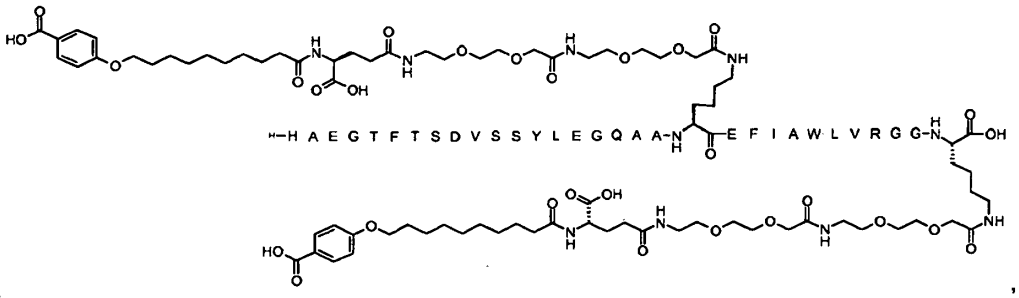
180. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 178 y 179, que es un derivado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-176.

181. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-180, que se selecciona de los siguientes:

(i)

péptido $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butanoil]amino]-etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-(Arg^{34},Gly^{36},Lys^{37})-GLP-1-(7-37),

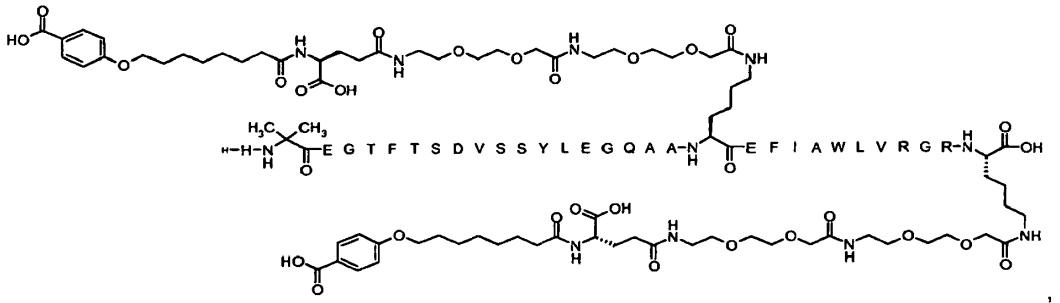
Chem. 62:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]- péptido GLP-1-(7-37),

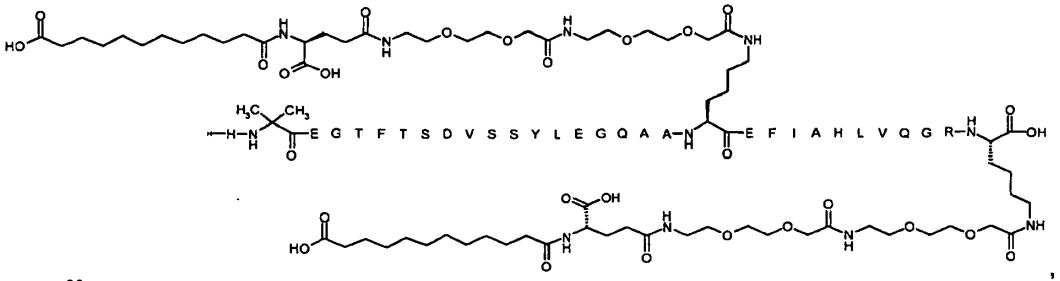
Chem. 58:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil-amino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8}, His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]- Péptido GLP-1(7-37),

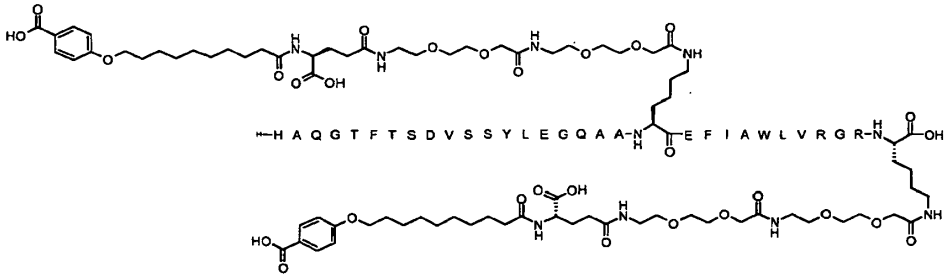
Chem. 40:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino] butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Gln^{9},Arg^{34},Lys^{37}]- péptido GLP-1-(7-37),

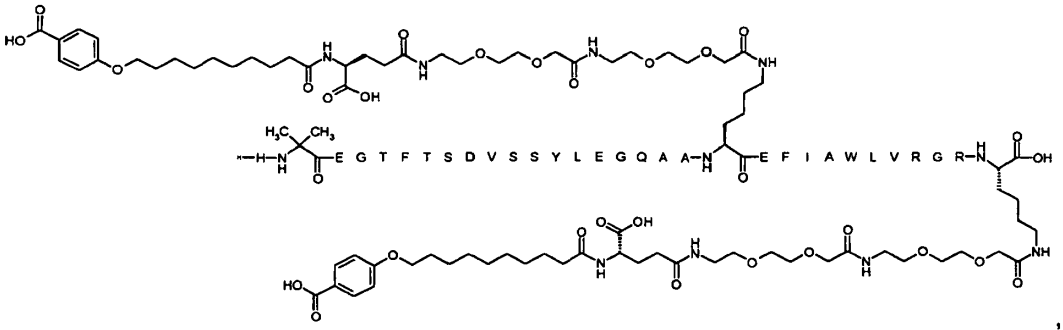
Chem. 56:



,

$N^{\varepsilon 26}$\{2-[2-(2-\{2-[2-(2-\{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino\}etoxi)etoxi]-acetilamino\}etoxi)etoxi]acetil\}, $N^{\varepsilon 37}$-\{2-[2-(2-\{2-[2-(2-\{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butirilamino\}etoxi)etoxi]acetilamino\}etoxi)etoxi]acetil\}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37\},

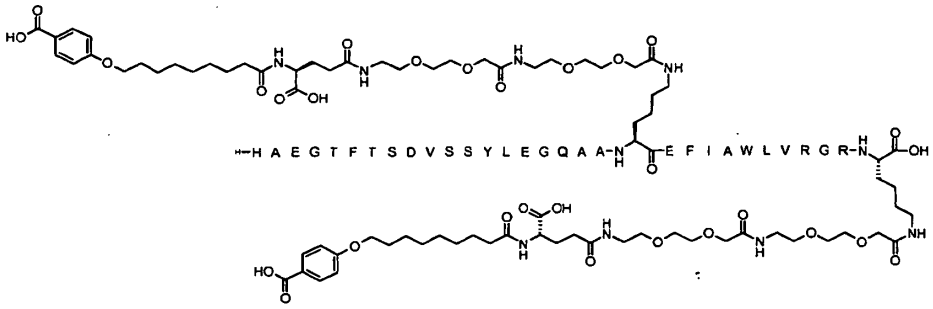
Chem. 21:



,

N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[9-(4-carboxifenoxi)nonanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[9-(4-carboxifenoxi)nonanoilamino]-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

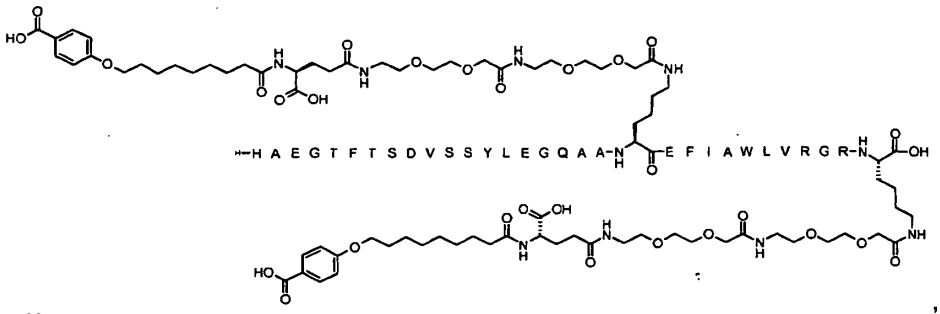
Chem. 63:



,

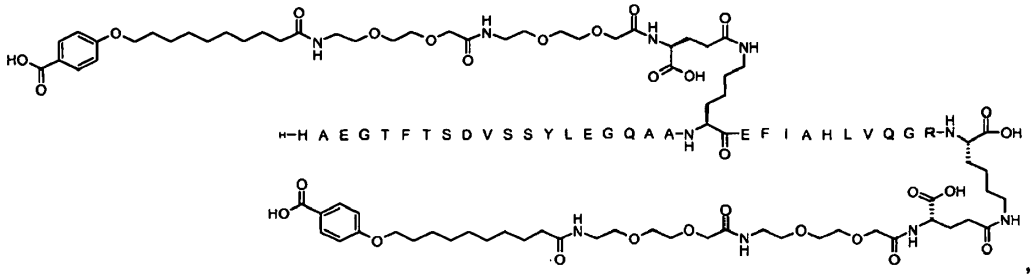
$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi)acetil]-$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino) etoxi]etoxi)acetil][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

Chem. 63:



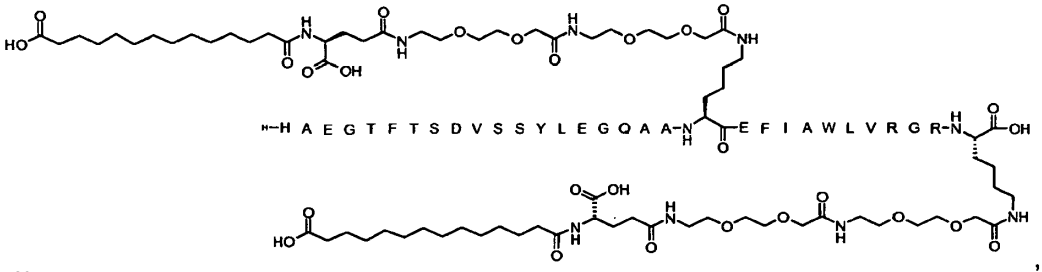
N$^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil], N$^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoil-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 55:



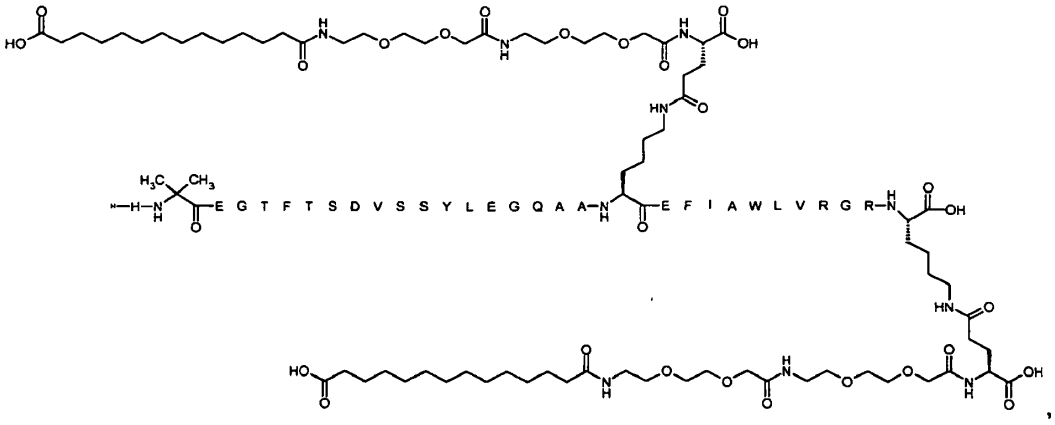
N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N$^{\varepsilon 27}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg34, Lys37]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 51:



N$^{\varepsilon 26}$-[(S)4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi] acetilamino}butiril],N$^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetil-amino]etoxi)etoxi] acetilamino}butiril][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

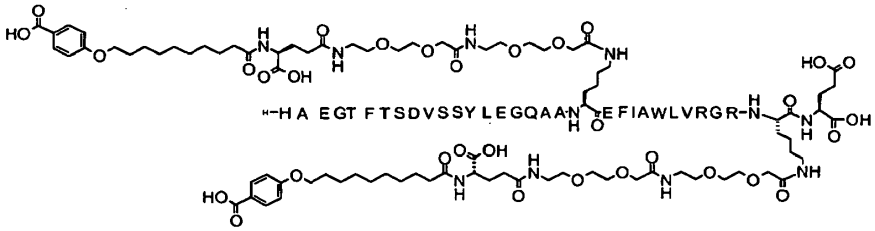
Chem. 44:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)-Glu, y

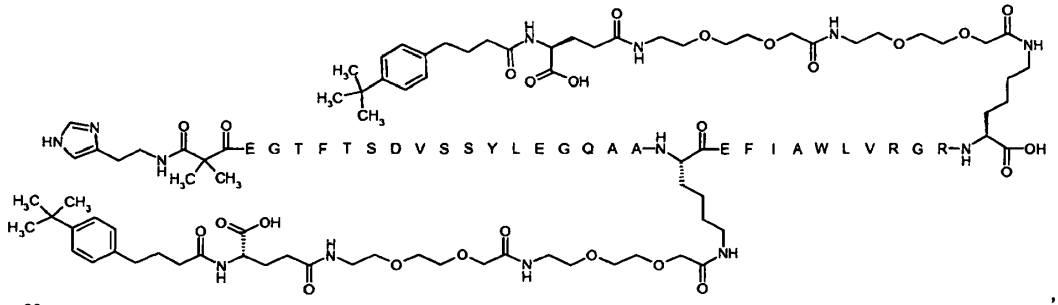
Chem. 64:



;

(ii) N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metilpropionil}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-terc-butil-fenil)butirilamino]-4-carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butilfenil)butirilamino]-4-carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37),

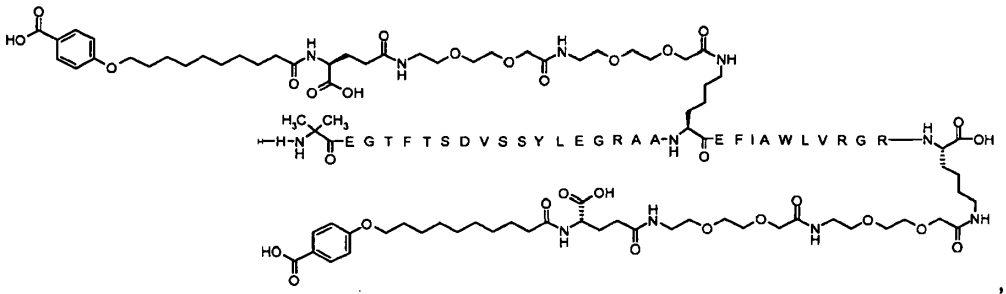
Chem. 46:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{23},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

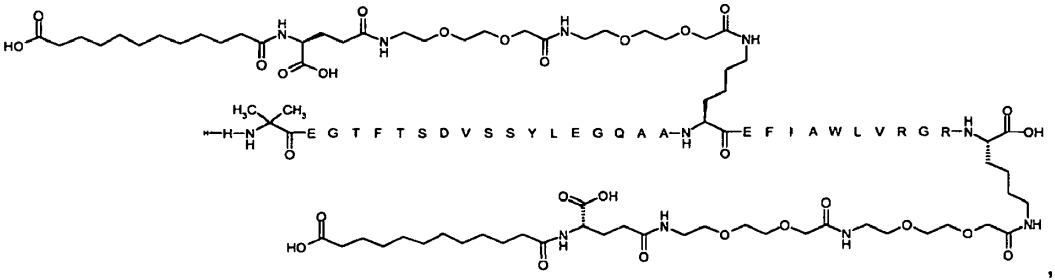
Chem. 50:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}-etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]-péptidoGLP-1(7-37),

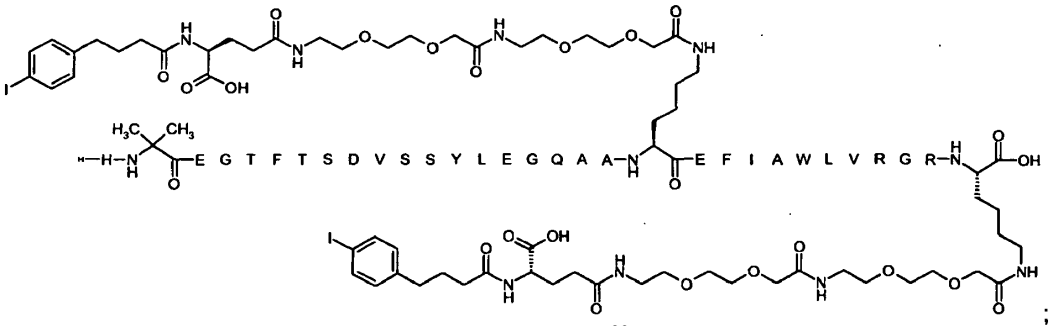
Chem. 24:



,

$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^8,Arg^{34},Lys^{34}]-péptido GLP-1(7-37), y

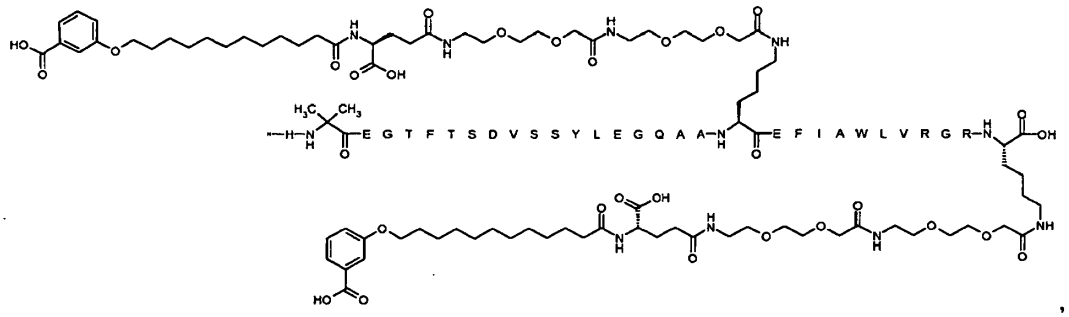
Chem. 31:



;

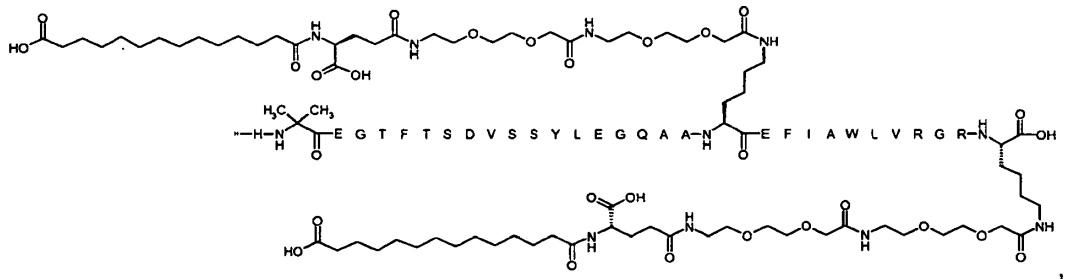
(iii) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]-butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^8,Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

Chem. 35:



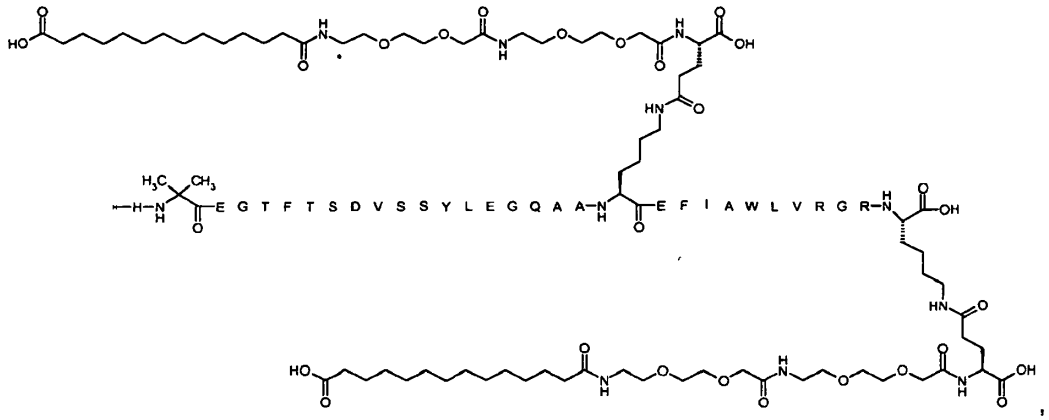
$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}-etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37)

Chem. 23:



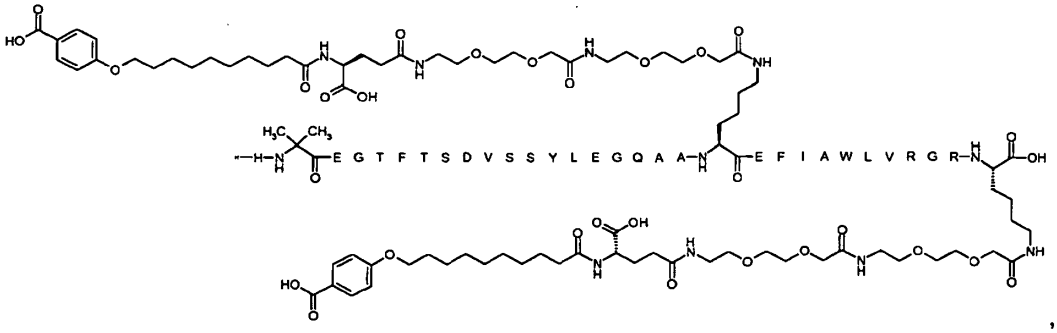
$N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-amino}butiril],$N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi)etoxi] acetilamino}butiril][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

Chem. 44:



$N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butiril-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

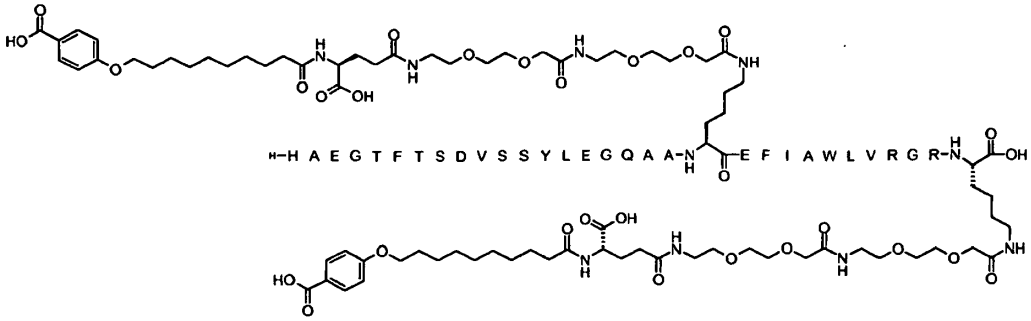
Chem. 21:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37), y

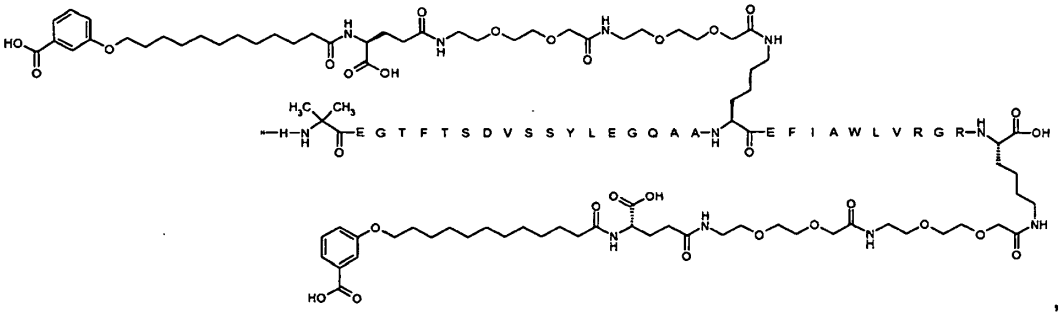
Chem. 48:



;

(iv) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]-butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

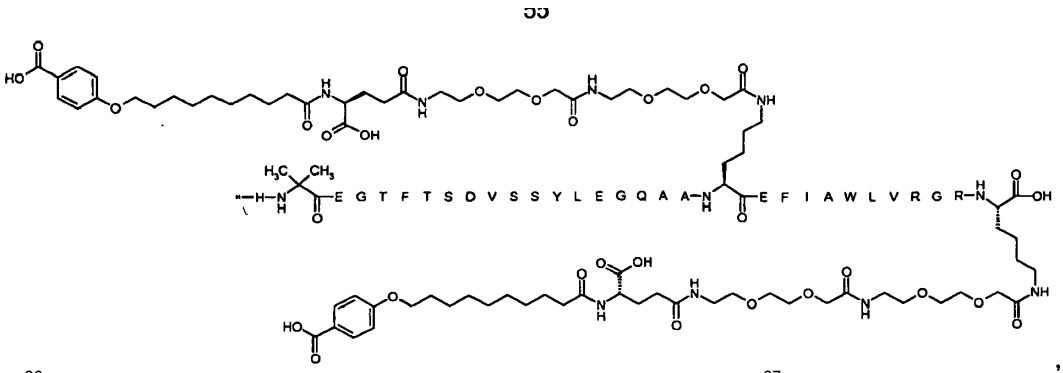
Chem. 35:



,

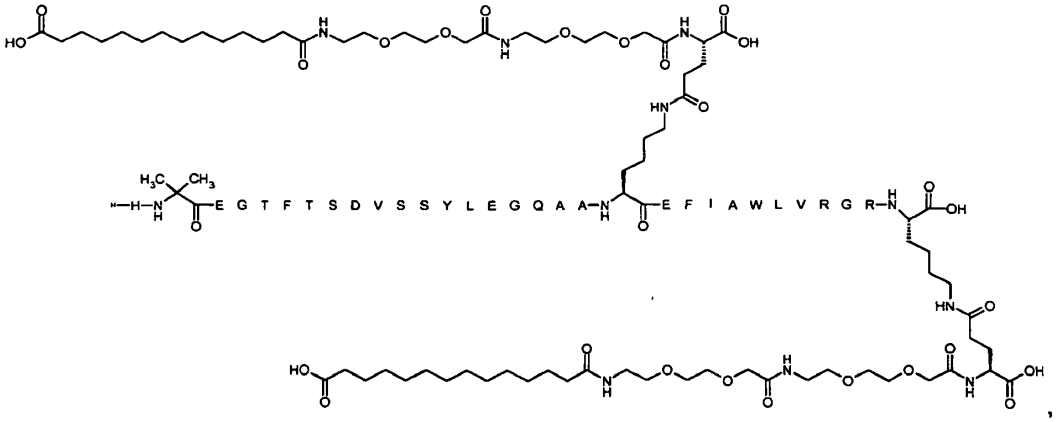
$N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butiril-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

Chem. 21:



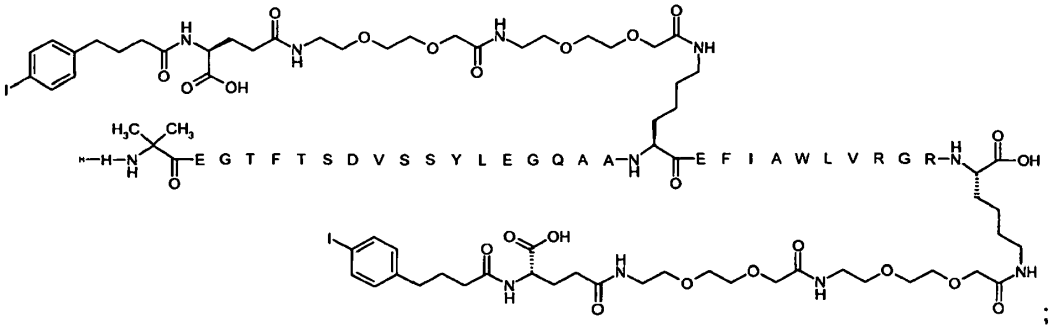
$N^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]], $N^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida,

Chem. 44:



$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37), y

Chem. 31:



o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos.

182. El derivado de la realización 181, que es Chem. 62, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

183. El derivado de la realización 181, que es Chem. 40, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

184. El derivado de la realización 181, que es Chem. 21, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

185. El derivado de la realización 181, que es Chem. 55, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

186. El derivado de la realización 181, que es Chem. 51, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

187. El derivado de la realización 181, que es Chem. 44, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
188. El derivado de la realización 181, que es Chem. 46, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
189. El derivado de la realización 181, que es Chem. 31, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
190. El derivado de la realización 181, que es Chem. 35, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
191. El derivado de la realización 181, que es Chem. 23, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
192. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-191, que tiene actividad de GLP-1.
193. El derivado de la realización 192, en el que la actividad de GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
194. El derivado de la realización 193, en el que la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro, como la potencia de producción de cAMP.
195. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-194, que tiene una potencia correspondiente a una CE_{50}
a) inferior a 10.000 pM, más preferiblemente inferior a 5.000 pM, aún más preferiblemente inferior a 4.000 pM, o muy preferiblemente inferior a 3.000 pM.
b) a o inferior a 3.000 pM, preferiblemente inferior a 3.000 pM, más preferiblemente inferior a 2.500 pM, aún más preferiblemente inferior a 2.000 pM, o muy preferiblemente inferior a 1.500 pM;
c) inferior a 2.000 pM, preferiblemente inferior a 1.000 pM, más preferiblemente inferior a 800 pM, aún más preferiblemente inferior a 600 pM, o muy preferiblemente inferior a 500 pM;
c) inferior a 400 pM, preferiblemente inferior a 300 pM, más preferiblemente inferior a 200 pM, aún más preferiblemente inferior a 150 pM, o muy preferiblemente inferior a 100 pM;
d) inferior a 80 pM, preferiblemente inferior a 60 pM, más preferiblemente inferior a 50 pM, aún más preferiblemente inferior a 40 pM, o muy preferiblemente inferior a 30 pM; o que tiene una potencia correspondiente a una CE_{50}
e) que es menor que 10 veces la CE_{50} de semaglutida, preferiblemente inferior a 8 veces la CE_{50} de semaglutida, más preferiblemente inferior a 6 veces la CE_{50} de semaglutida, aún más preferiblemente menos de 4 veces la CE_{50} de semaglutida, o muy preferiblemente inferior a dos veces la CE_{50} de semaglutida;
f) que es menor que 10 veces la CE_{50} de liraglutida, preferiblemente menor que 8 veces la CE_{50} de liraglutida, más preferiblemente menor que 6 veces la CE_{50} de liraglutida, aún más preferiblemente menor que 4 veces la CE_{50} de liraglutida, o muy preferiblemente menor que dos veces la CE_{50} de liraglutida; o
g) que es menor que la CE_{50} de liraglutida, preferiblemente menor que 0,8 veces la CE_{50} de liraglutida, más preferiblemente menor que 0,6 veces la CE_{50} de liraglutida, aún más preferiblemente menor que 0,5 veces la CE_{50} de liraglutida, o muy preferiblemente menor que o igual a 0,4 veces la CE_{50} de liraglutida.
196. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-195, en el que la potencia se determina como CE_{50} para la curva dosis-respuesta que muestra la formación dependiente de la dosis de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, utilizando preferiblemente un linaje de células transfectadas estables tales como BHK467-12A (pK-ts13), y/o utilizando para la determinación de cAMP un ensayo funcional de receptores, v.g. basado en la competición entre cAMP formado endógenamente y cAMP marcado con adición de biotina añadido exógenamente, en cuyo ensayo cAMP se captura más preferiblemente utilizando un anticuerpo específico, y/o en el que un ensayo aún más preferido es el Ensayo de cAMP AlphaScreen, muy preferiblemente el descrito en el Ejemplo 50.
197. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-196, para el cual la ratio [afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% HSA (albúmina alta), dividido por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% de HSA (albúmina baja) es:
a) al menos 0,5, preferiblemente al menos 1,0, más preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 20, o muy preferiblemente al menos 30;
b) al menos 40, preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 60, aún más preferiblemente al menos 70, o muy preferiblemente al menos 80;
c) al menos 90, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 200, todavía más preferiblemente al menos 300, aún más preferiblemente al menos 400, o muy preferiblemente al menos 500;
d) al menos 120, preferiblemente al menos 140, aún más preferiblemente al menos 160, o muy preferiblemente al menos 180;
e) al menos 20% de la ratio de semaglutida, preferiblemente al menos 50% de la ratio de semaglutida, más preferiblemente al menos 75% de la ratio de semaglutida, o muy preferiblemente al menos igual a la ratio de semaglutida; o
f) al menos igual a la ratio de liraglutida, preferiblemente al menos dos veces la ratio de liraglutida, más preferiblemente al menos tres veces la ratio de liraglutida, aún más preferiblemente al menos cuatro veces la ratio de liraglutida, o muy preferiblemente al menos cinco veces la ratio de liraglutida.
198. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-97, para el cual la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA (albúmina baja) es
a) inferior a 1000,00 nM, preferiblemente inferior a 600,00 nM, más preferiblemente inferior a 100,00 nM, o muy preferiblemente inferior a 50,00 nM; o

b) inferior a 20,00 nM, preferiblemente inferior a 10,00 nM, más preferiblemente inferior a 5,00 nM, aún más preferiblemente inferior a 2,00 nM, o muy preferiblemente inferior a 1,00 nM.

199. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-198, para el cual la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% HSA (albúmina alta) es

a) inferior a 1100,00 nM, preferiblemente inferior a 1000,00 nM, más preferiblemente inferior a 800,00 nM, o muy preferiblemente inferior a 600,00 nM; o

b) inferior a 400,00 nM, preferiblemente inferior a 300,00 nM, más preferiblemente inferior a 200,00 nM, aún más preferiblemente inferior a 100,00 nM, o muy preferiblemente inferior a 50,00 nM.

200. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-199, en el que la afinidad de fijación al receptor de GLP-1 se mide por desplazamiento de ^{125}I-GLP-1 del receptor, preferiblemente utilizando un ensayo de fijación SPA.

201. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-200, en el que el receptor de GLP-1 se prepara utilizando un linaje de células transfectadas estables, preferiblemente un linaje de células de hámster, más preferiblemente un linaje de células de riñón de cría de hámster, tal como BHK tk-ts13.

202. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-201, en el que el valor CI_{50} se determina como la concentración que desplaza el 50% de ^{125}I-GLP-1 del receptor.

203. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-202, que tiene una biodisponibilidad oral, preferiblemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de semaglutida.

204. El derivado de la realización 203, en el que la biodisponibilidad oral se mide in vivo en ratas, como exposición en plasma después de inyección directa en el lumen intestinal.

205. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-204, para el cual la concentración en plasma (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de la inyección de una solución del derivado en el yeyuno de la rata, dividida por la concentración (µM) de la solución inyectada (exposición a 30 min corregida por dosis) es al menos 40, preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 60, todavía más preferiblemente al menos 70, aún más preferiblemente al menos 80, o muy preferiblemente al menos 100.

206. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-205, para el cual la concentración en plasma (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de inyección de una solución del derivado en el yeyuno de la rata, dividida por la concentración (µM) de la solución inyectada (exposición a 30 min corregida por dosis) es al menos 110, preferiblemente al menos 120, más preferiblemente al menos 130, todavía más preferiblemente al menos 140, aún más preferiblemente al menos 150, o muy preferiblemente al menos 160.

207. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-206, para el cual la concentración en plasma (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de inyección de una solución del derivado en el yeyuno de la rata, dividida por la concentración (µM) de la solución inyectada (exposición a 30 min corregida por dosis) es al menos 180, preferiblemente al menos 190, más preferiblemente al menos 200, o muy preferiblemente al menos 210.

208. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-207, en el que el derivado GLP-1 se testa en una concentración de 1000 µm en mezcla con 55 mg/ml de caprato de sodio.

209. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-208, en el que se utilizan ratas macho Sprague Dawley, preferiblemente con un peso corporal a su recepción de aproximadamente 240 g.

210. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-209, en el que las ratas se mantienen en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes del experimento.

211. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-210, en el que las ratas se someten a anestesia general después de haber ayunado y antes de la infección del derivado en el yeyuno.

212. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-211, en el que el derivado se administra en la parte proximal del yeyuno (10 cm distal al duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal al ciego).

213. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-212, en el que se inyectan 100 µl del derivado en el lumen del yeyuno a través de un catéter con una jeringuilla de 1 ml, y subsiguientemente se impulsan 200 µl de aire en el lumen del yeyuno con otra jeringuilla, que se deja luego conectada al catéter para prevenir el retroceso del flujo al catéter.

214. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-213, en el que se recogen muestras de sangre (200 µl) en tubos de EDTA de la vena de la cola a intervalos deseados, tales como al cabo de los tiempos 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min, y se centrifugan durante 5 minutos a 10.000 G, a 4ºC en el transcurso de 20 minutos.

215. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-214, en el que se separa plasma (75 µl), se congela inmediatamente, y se mantiene a -20ºC hasta que se analiza respecto a concentración en plasma del derivado.

216. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-215, en el que se utiliza LOCI (Inmunoensayo de Luminiscencia por Canalización de Oxígeno) para analizar la concentración en plasma del derivado.

217. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-216, en el que el derivado es eficaz para disminuir la glucosa en sangre in vivo en ratones db/db.

218. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-217, en el que el derivado es eficaz para disminuir la el peso corporal in vivo en ratones db/db.

219. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-218, en el que los ratones db/db se tratan, subcutáneamente, con una gama adecuada de dosis del derivado de GLP-1, y se determina(n) la glucosa en sangre y/o el peso corporal a intervalos apropiados.

220. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-219, en el que la dosis del derivado de GLP-1 es 0,3 nmol/Kg, 1,0 nmol/Kg, 3,0 nmol/Kg, 10,0 nmol/Kg, 30 nmol/Kg, y 100 nmol/Kg, en el que Kg se refiere al peso corporal del ratón.

221. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-220, en el que se trata un grupo de control con vehículo, subcutáneamente, preferiblemente el medio en el que se disuelve el derivado de GLP-1, v.g. con la composición siguiente: fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0,05% Tween 80, pH 7,4.

222. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-221, en el que se determina glucosa en sangre, y/o se pesan los ratones, a intervalos de -½ h (media hora antes de la dosificación (t = 0)), y en los tiempos de 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, y 96 horas).

223. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-222, en el que la concentración de glucosa se mide utilizando el método de la glucosa-oxidasa.

224. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-223, en el cual

(i) se calcula la DE_{50} (peso corporal (BW)) como la dosis que da lugar al efecto semi-máximo sobre delta BW (v.g., disminución) 24 horas después de la administración s.c. del derivado; y/o

(ii) se calcula DE_{50} (glucosa en sangre (BG)) como la dosis que da lugar al efecto semi-máximo sobre AUC (área bajo la curva), de delta (v.g., disminución) BG 8 horas después de la administración s.c. del derivado.

225. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-224, en el que existe una relación sigmoidal dosis-respuesta, preferiblemente con una definición clara de la respuesta máxima.

226. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-225, que tiene un perfil de acción más prolongado que liraglutida.

227. El derivado de la realización 226, en el que efecto prolongado significa semivida in vivo en una especie animal relevante, tal como ratones db/db, rata, cerdo, y/o, preferiblemente, lechón; en el que el derivado se administra i) s.c., y/o, preferiblemente, ii) s.c..

228. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-227, en el que la semivida terminal ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en lechones es

a) al menos 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 36 horas, aún más preferiblemente al menos 48 horas, o muy preferiblemente al menos 60 horas;

b) al menos 7 horas, preferiblemente al menos 16 horas, más preferiblemente al menos 24 horas, aún más preferiblemente al menos 30 horas, o muy preferiblemente al menos 40 horas;

c) al menos 44 horas, preferiblemente al menos 55 horas, más preferiblemente al menos 66 horas, aún más preferiblemente al menos 77 horas, o muy preferiblemente al menos 88 horas; o

d) al menos 0,2 veces la semi-vida de semaglutida, preferiblemente al menos 0,4 veces la semi-vida de semaglutida, más preferiblemente al menos 0,6 veces la semi-vida de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 0,8 veces la semi-vida de semaglutida, o muy preferiblemente al menos igual que la semi-vida de semaglutida.

229. El derivado de la realización 228, en el que los lechones son lechones macho Göttingen.

230. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-229, en el que los lechones tienen una edad de 7-14 meses, y preferiblemente pesan de 16 a 35 Kg.

231. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-230, en el que los lechones se alojan individualmente, y se alimentan una sola vez o dos veces al día, preferiblemente con dieta SDS para lechones.

232. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-231, en el que el derivado se dosifica, i.v., después de al menos dos semanas de aclimatación.

233. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-232, en el que los animales se mantienen en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes de la dosificación y durante al menos 4 horas después de la dosificación, y tienen acceso de agua *ad libitum* durante todo el periodo.

234. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-233, en el que el derivado de GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0,05% Tween 80, pH 7,4 a una concentración adecuada, preferiblemente de 20 a 60 nmol/ml.

235. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 227-234, en el que se administran inyecciones i.v. del derivado en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/Kg.

236. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-235, que aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa en los lechones.

237. El derivado de la realización 236, en el que los lechones son lechones macho Göttingen.

238. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-237, en el que los lechones tienen una edad de 7-14 meses.

239. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-238, en el que los lechones se alojan en corrales simples, y se alimentan una o dos veces al día, preferiblemente con pienso SDS para lechones.

240. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-239, en el que se administra una sola dosis, opcionalmente después de un periodo con escalación de la dosis, i.v., o subcutánea, en la piel delgada detrás de la oreja.

241. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-240, en el que los animales se mantienen en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes de la dosificación.

242. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-241, en el que se testan un grupo de línea base y varios grupos de dosis de derivados correspondientes a 2-6 niveles diferentes de concentración en plasma, en el que el grupo de la línea base a) se trata con vehículo, o b) no se somete a tratamiento alguno.

243. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-242, en el que el nivel de concentración en plasma es 3.000-80.000 pM.

244. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-243, en el que se realiza un test de 1 ó dos horas de tolerancia i.v. a la glucosa (IVGTT).

245. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-244, en el que se administran 0,3 g/Kg de glucosa i.v. durante un periodo de 30 segundos, y se toman muestras de sangre en momentos adecuados, tales como los momentos siguientes (t = 0 corresponde al bolus de glucosa): -10, -5, 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, y 120 minutos.

246. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-245, en el que se determina la concentración en plasma del derivado, glucosa, e insulina.

247. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-246, en el que se mide la concentración del derivado en el momento t = 0 min, y, opcionalmente, al final del test (t = 60 min, o t = 120 min).

248. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-247, en el que la glucosa se analiza utilizando el método glucosa-oxidasa.

249. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-248, en el que se calcula el área bajo la curva de insulina (AUCinsulina) y se utiliza como medida de la secreción de insulina.

250. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 236-249, en el que para al menos una concentración de la misma, la AUCinsulina es mayor que la AUCinsulina de la línea base, preferiblemente al menos 110% de la misma, más preferiblemente al menos 120% de la misma, aún más preferiblemente al menos 130% de la misma o muy preferiblemente al menos 140% de la misma.

251. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-250, que causa una ingesta reducida de alimento en los cerdos con relación a un control (preferiblemente tratado con vehículo, o sin tratar);

Opcionalmente, la ingesta de alimento (0-24 horas) puede ser 90% o menor con relación al control tratado con vehículo, preferiblemente 80% o menos, más preferiblemente 70% o menos, aún más preferiblemente 60% o menos, o muy preferiblemente 50% o menos;

en el que la ingesta de alimento (0-24 horas) se refiere a las 24 primeras horas después de la administración del derivado o vehículo.

252. El derivado de la realización 251, en el que los cerdos son cerdos hembra Landrace Yorkshire Duroc (LYD).

253. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-252, en el que los cerdos tienen 3 meses de edad, y preferiblemente tienen un peso de 30-35 Kg.

254. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-253, en el que los animales se alojan en un grupo durante 1-2 semanas para aclimatación.

255. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-254, en el que durante el periodo experimental, los animales se colocan en corrales individuales desde el lunes por la mañana al viernes por la tarde para medida de la ingesta individual de alimento.

256. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-255, en el que los animales se alimentan *ad libitum* con pienso para cerdos (tal como Svinefoder, Antonio).

257. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-256, en el que la ingesta de alimento se monitoriza en línea por registro del peso de pienso cada 15 minutos, utilizando preferiblemente el sistema Mpigwin.

258. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-257, que está dosificado a 0,3, 1,0, 3,0, 10, ó 30 nmol/Kg, disuelto preferiblemente en un tampón de fosfato (fosfato 50 mM, 0,05% Tween 80, pH 8), más preferiblemente en concentraciones de 12, 40, 120, 400, ó 1200 nmol/ml.

259. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-258, en el que el tampón de fosfato sirve como vehículo.

260. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 251-259, en el que los animales se dosifican con una sola dosis s.c. del derivado, o vehículo (preferiblemente con un volumen de dosis de 0,025 ml/Kg), por la mañana del día 1, y se mide la ingesta de alimento durante 4 días después de la dosificación.

261. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-260, que tiene una semi-vida in vitro ($T_{1/2}$), en un extracto de intestino delgado de rata, dividido por la semi-vida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37), de al menos 0,4, preferiblemente superior a 0,5, más preferiblemente superior a 1,0, aún más preferiblemente superior a 2,0, todavía más preferiblemente superior a 3,0, o muy preferiblemente superior a 4,0.

262. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-261, que tiene una semi-vida in vitro ($T_{1/2}$), en un extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semi-vida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37), superior a 5,0, preferiblemente superior a 6,0, más preferiblemente superior a 7,0, aún más preferiblemente superior a 8,0, todavía más preferiblemente superior a 9,0, o muy preferiblemente superior a 10,0.

263. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 261-262, en el que el extracto de intestino delgado de rata se prepara como se describe en el Ejemplo 57, el derivado se incuba durante 1 hora a 37ºC, la concentración del extracto se titula de tal modo que la semi-vida de GLP-1 (7-37) está comprendida en el intervalo de 10-20 minutos, v.g., 1,4 µg/ml, las muestras resultantes se analizan por UPLC y/o MALDI-TOF, y/o la incubación y el análisis se realizan como se describe n el Ejemplo 57.

264. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-263, para el cual una ratio [semivida ($T_{1/2}$) in vitro en extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semi-vida ($T_{1/2}$) in vitro en extracto del intestino delgado de rata de GLP-1 (7-37)] es al menos 0,5 veces la ratio correspondiente de semaglutida, preferiblemente al menos dos veces la ratio de semaglutida, más preferiblemente al menos 3 veces la ratio de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 5 veces la ratio de semaglutida, o muy preferiblemente al menos 7 veces la ratio de semaglutida.

265. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-264, para el cual una ratio [semi-vida ($T_{1/2}$) en extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semi-vida ($T_{1/2}$) en extracto del intestino delgado de rata de GLP-1 (7-37)] es al menos 0,1 veces la ratio correspondiente de liraglutida, preferiblemente al menos 0,4 veces la ratio de liraglutida, más preferiblemente al menos 0,8 veces la ratio de liraglutida, aún más preferiblemente al menos 1,2 veces la ratio de liraglutida, o muy preferiblemente al menos 1,5 veces la ratio de liraglutida.

266. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-265, que tiene una semi-vida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. de al menos 4 horas, preferiblemente al menos 6 horas, aún más preferiblemente al menos 8 horas, o muy preferiblemente al menos 10 horas.

267. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-266, que tiene una semi-vida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. de al menos 12 horas, preferiblemente al menos 15 horas, aún más preferiblemente al menos 18 horas, o muy preferiblemente al menos 20 horas.

268. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-266, que tiene una semi-vida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. de al menos 24 horas, preferiblemente al menos 26 horas, o muy preferiblemente al menos 30 horas.

269. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 266-268, en el que las ratas son ratas macho Sprague Dawley con un peso corporal de 300 a 600 g.

270. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-269, que tiene una semi-vida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. que es al menos igual que la semi-vida de semaglutida, preferiblemente al menos dos veces la semi-vida de semaglutida, más preferiblemente al menos 3 veces la semi-vida de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 4 veces la semi-vida de semaglutida, o muy preferiblemente al menos 5 veces la semi-vida de semaglutida.

271. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-270, que no es el compuesto de los Ejemplos 17, 21, 33, 34, 35, y 36; preferiblemente no es Chem. 36, Chem. 40, Chem. 52, Chem. 53, Chem. 54, y Chem. 55.

272. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-271, que no es el compuesto de los Ejemplos 22, 23, 27, y 41; preferiblemente no es Chem. 41, Chem. 42, Chem. 46, y Chem. 60.

273. El derivado del Ejemplo 19; preferiblemente Chem. 38.

274. El derivado del Ejemplo 10; preferiblemente Chem. 29.

275. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que comprende las modificaciones siguientes comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1):

(A) (i) (8Aib, 31 H, 34Q, 37K); (ii) (des7-8, 34R, 37K, 38E); (iii) (des7-8, 34R, 37K); (iv) (8Aib, 9G, 34R, 37K); (v) (8Aib, 23R, 34R, 37K); (vi) (31 H, 34Q, 37K); (vii) (9Q, 34R, 37K); (iix) (30E, 34R, 37K); (ix) (34R, 37K, 38G); (x) (34R, 36G, 37K); o (xi) (34R, 37K, 38E);

en el que el análogo se selecciona preferiblemente de los análogos siguientes de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1):

(B) (i-a) (8Aib, 31 H, 34Q, 37K); (ii-a) (des7-8, 34R, 37K, 38E); (iii-a) (des7-8, 34R, 37K); (iv-a) (8Aib, 9G, 34R, 37K); (v-a) (8Aib, 23R, 34R, 37K); (vi-a) (31 H, 34Q, 37K); (vii-a) (9Q, 34R, 37K); (iix-a) (30E, 34R, 37K); (ix-a) (34R, 37K, 38G); (x-a) (34R, 36G, 37K); (xi-a) (34R, 37K, 38E); (xii-a) (7Imp, 34R, 37K); (xiii-a) (8Aib, 34R, 37K); y (xiv-a) (34R, 37K);

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los análogos de (a) o (b).

276. El análogo de la realización 275, en el que la comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por escritura a mano y por observación visual.

277. El análogo de la realización 275, en el que la comparación con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por el uso de un programa estándar de alineación de proteínas o péptidos.

278. El análogo de la realización 277, en el que el programa de alineación es una alineación Needleman-Wunsch.

279. El análogo de una cualquiera de las realizaciones 277-278, en el que se utilizan la matriz de registro por defecto y la matriz de identidad por defecto.

280. El análogo de una cualquiera de las realizaciones 277-279, en el que la matriz de registro es BLSUM62.

281. El análogo de una cualquiera de las realizaciones 277-280, en el que la penalidad por el primer residuo en una laguna es -10 (menos diez).

282. El análogo de una cualquiera de las realizaciones 277-281, en el que las penalidades por residuos adicionales en una laguna son -0,5 (menos cero coma cinco).

283. El análogo de una cualquiera de las realizaciones 277-282, que tiene actividad de GLP-1.

284. El análogo de la realización 283, en el que la actividad de GLP-1 se refiere como se describe en las realizaciones 192-196.

285. Un producto intermedio que comprende un resto de prolongación seleccionado de Chem. 2c, Chem. 3b, y Chem. 4b:

Chem. 2c:	$HOOC\text{-}C_6H_4\text{-}O\text{-}(CH_2)_y\text{-}CO\text{-}PG$
Chem. 3b:	$R^1\text{-}C_6H_4\text{-}(CH_2)_z\text{-}CO\text{-}PG$
Chem. 4b:	$HOOC\text{-}C_4SH_2\text{-}(CH_2)_w\text{-}CO\text{-}PG$

en las cuales y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da, w es un número entero en el intervalo de 6-18, y *-PG es un grupo protector; en el que, opcionalmente, el grupo distal *-COOH del resto de prolongación, si está presente, está protegido también; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

286. El producto intermedio de la realización 285, en el que *-CO-PG es i) *-COOH, o ii) un éster activado.

287. El producto intermedio de la realización 286, en el que el éster activado es un éster de p-nitrofenol; 2,4,5-trichlorophenol; N-hidroxisuccinimida; N-hidroxisulfosuccinimida; 3,4-dihidro-3-hidroxi-1,2,3-benzotriazina-4-ona; 5-cloro-8-hidroxiquinolina; imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico; pentafluorofenol; p-sulfotetrafluorofenol; N-hidroxiftalimida; 1-hidroxibenzotriazol; 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; N-hidroximaleimida; ácido 4-hidroxi-3-nitro benceno-sulfónico; o cualquier otro éster activado conocido en la técnica.

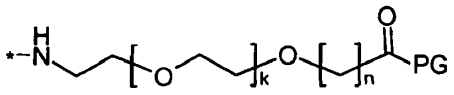
288. El producto intermedio de una cualquiera de las realizaciones 285-287, que comprende

a) un resto de prolongación seleccionado de Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 2: $HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$
Chem. 3: $R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$
Chem. 4: $HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO*$

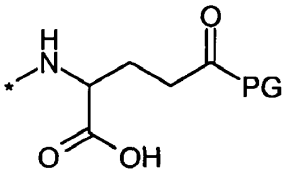
en las cuales y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da, y w es un número entero en el intervalo de 6-18; y b) un enlazador seleccionado de Chem. 5b, Chem. 6, y Chem. 7:

Chem. 5b:



,

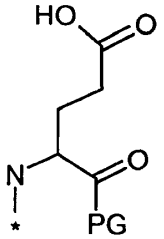
Chem. 6a:



,

y/o

Chem. 7a:



,

en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5; y PG es un grupo protector; en el que opcionalmente, el grupo *-COOH del grupo de prolongación, si está presente, está protegido también preferiblemente como se conoce en la técnica, preferiblemente funcionalizado como un éster no reactivo; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

289. El producto intermedio de una cualquiera de las realizaciones 285-288, en el que el enlazador es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-57.

290. El producto intermedio de una cualquiera de las realizaciones 285-289, en el que el resto de prolongación es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-87.

291. Un producto intermedio que comprende, preferiblemente está constituido por,

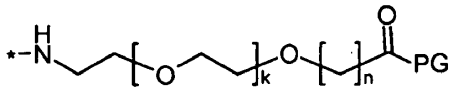
a) un resto de prolongación seleccionado de Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 2: $HOOC-C_6H_4-O-(CH_2)_y-CO-*$
Chem. 3: $R^1-C_6H_4-(CH_2)_z-CO-*$
Chem. 4: $HOOC-C_4SH_2-(CH_2)_w-CO-*$

en el cual y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da, y w es un número entero en el intervalo de 6-18; y

b) un enlazador que comprende Chem. 5b:

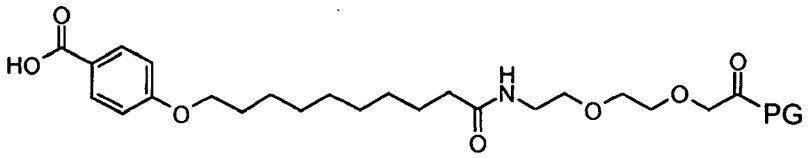
Chem. 5b:



en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero de 1-5; y PG es un grupo protector; en el que, opcionalmente, el grupo distal *-COOH del resto de prolongación, en su caso, está protegido también como se conoce en la técnica; preferiblemente por formación de un éster no reactivo; más preferiblemente i) es un éster de un alcohol con una cadena lateral voluminosa, tal como un éster de un fenol, opcionalmente sustituido; o ii) un éster de alquilo ramificado, preferiblemente alquilo inferior; muy preferiblemente protegido como OtBu, OBz, y análogos; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

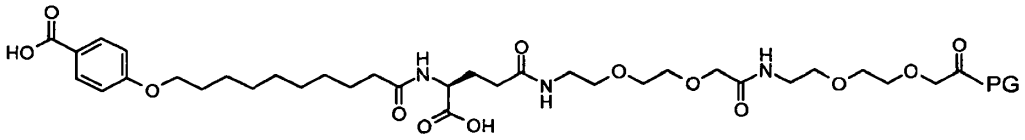
292. Un producto intermedio, preferiblemente conforme a una cualquiera de las realizaciones 285-291, seleccionado de los siguientes:

Chem. 69:



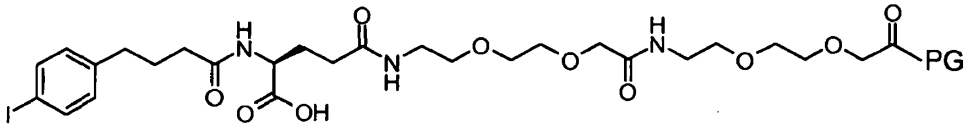
;

Chem. 70:



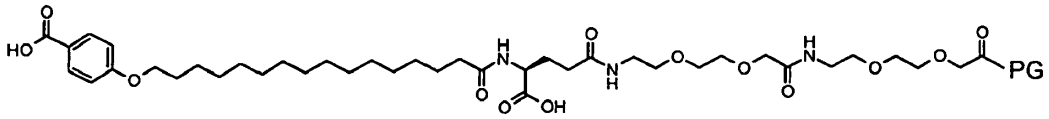
;

Chem. 71:



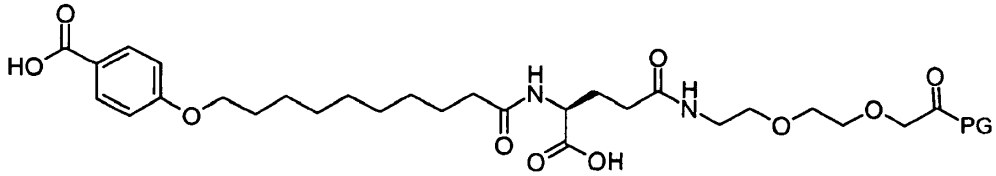
;

Chem. 72:



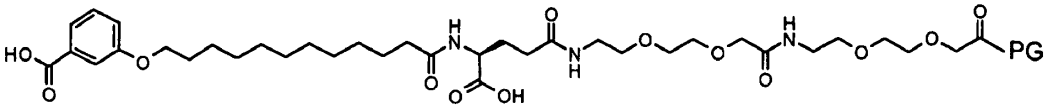
;

Chem. 73:



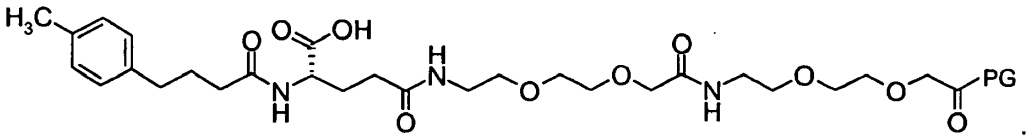
;

Chem. 74:



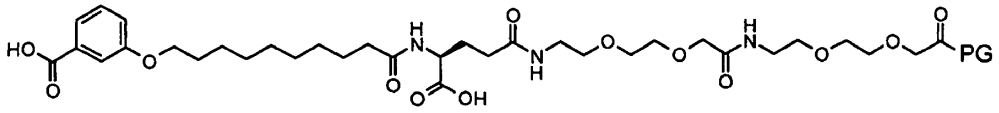
;

Chem. 75:



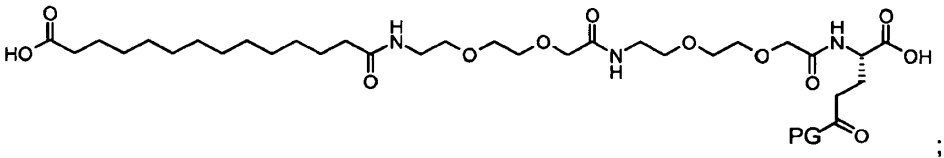
;

Chem. 76:



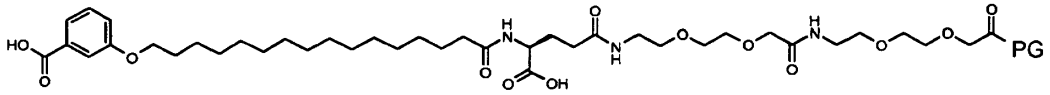
;

Chem. 77:



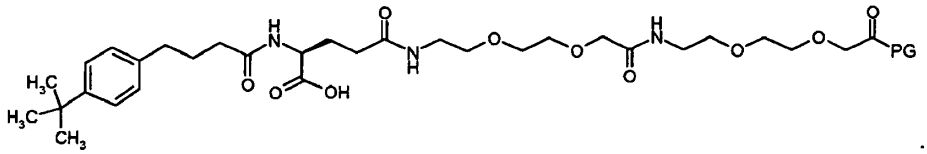
;

Chem. 78:



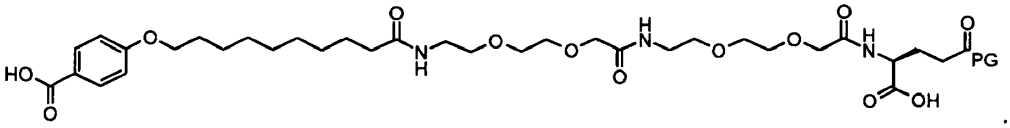
;

Chem. 79:



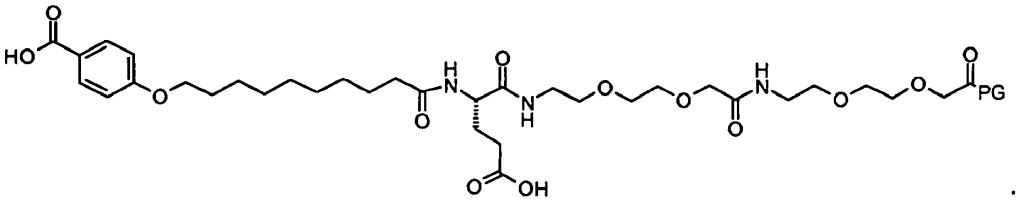
;

Chem. 80:

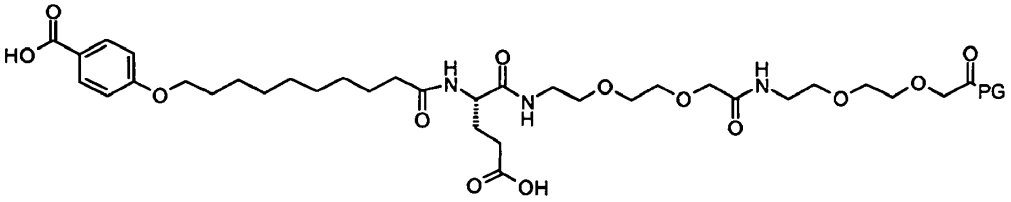


;

Chem. 81:

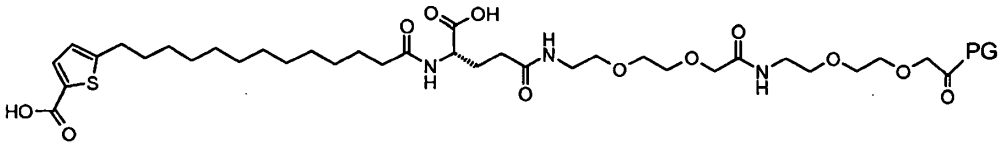


;



;

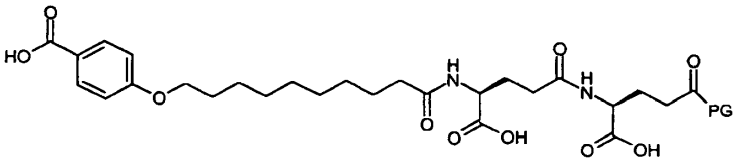
Chem. 82:



;

y

Chem. 83:



;

en el que, opcionalmente, uno o más del o los grupos *-COOH, preferiblemente el grupo distal *-COOH del resto de prolongación está protegido también.

293. Un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-274, para uso como medicamento.

294. Un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-274, para uso en el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

295. Uso de un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-274, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

296. Un método para el tratamiento o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética - por administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-274.

297. Un derivado de un análogo de GLP-1, que comprende un resto de prolongación seleccionado de Chem. 2, Chem. 3, y Chem. 4:

Chem. 2:	$HOOC\text{-}C_6H_4\text{-}O\text{-}(CH_2)_y\text{-}CO\text{-}*$
Chem. 3:	$R^1\text{-}C_6H_4\text{-}(CH_2)_z\text{-}CO\text{-}*$
Chem. 4:	$HOOC\text{-}C_4SH_2\text{-}(CH_2)_w\text{-}CO*$

en las cuales x es un número entero en el intervalo de 6-18, y es un número entero en el intervalo de 3-17, z es un número entero en el intervalo de 1-5, R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 DA, y w es un número entero en el intervalo de 6-18;
o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

298. El derivado de la realización 297, en el que el análogo de GLP-1 es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-296.

299. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 297-298, en el que el resto de prolongación es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-296.

300. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 297-299, que comprende adicionalmente un enlazador, preferiblemente como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-296.

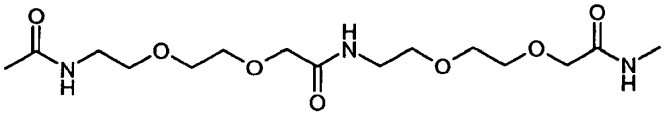
REALIZACIONES PARTICULARES ADICIONALES

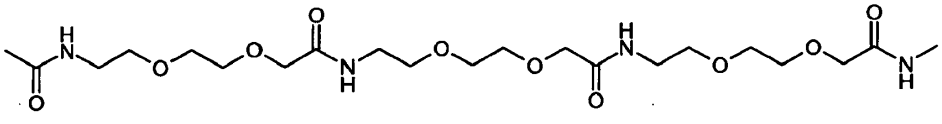
Las siguientes son realizaciones particulares adicionales relacionadas con la invención:

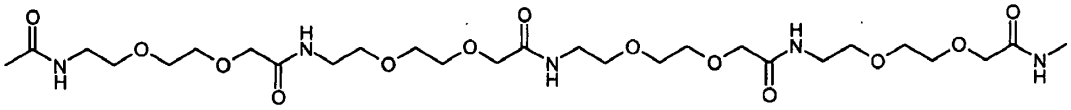
1. Un derivado de un análogo de GLP-1, en el que el análogo de GLP-1 es K^{37}-GLP-1 (7-37) o un análogo del mismo que tiene hasta 6 residuos de aminoácido cambiados comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), derivado que tiene dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación seleccionado de HOOC-$(CH_2)_n$-CO-, HOOC-C_6H_4-O-$(CH_2)_m$-CO-, y R^1-C_6H_4-$(CH_2)_p$-CO-, en el cual n es un número entero en el intervalo de 8-16, m es un número entero en el intervalo de 7-17, p es un número entero en el intervalo de 1-5, y R^1 es un grupo que tiene una masa molar no mayor que 150 Da; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El derivado de la realización 1, en el que n es un número par.
3. El derivado de la realización 2, en el que n es 8, 10, 12, 14, ó 16; preferiblemente 10, 12, ó 14.
4. El derivado de la realización 1, en el que m es un número impar.
5. El derivado de la realización 4, en el que m es 7, 9, 11, 13, 15, ó 17; preferiblemente 9, 11, ó 15; muy preferiblemente 9.
6. El derivado de la realización 1, en el que p es un número impar.
7. El derivado de la realización 6, en el que p es 1, 3, ó 5, preferiblemente 3.
8. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1 y 4-5, en el que el grupo COOH se halla en posición meta- o para-, preferiblemente en posición para.
9. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que R^1 tiene una masa molar no mayor que 130 Da, preferiblemente no mayor que 100 Da, más preferiblemente no mayor que 75 Da, aún más preferiblemente no mayor que 60 Da, o muy preferiblemente no mayor que 50 Da.
10. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-9, en el que R^1 tiene una masa molar no mayor que 40 Da, preferiblemente no mayor que 30 Da, más preferiblemente no mayor que 20 Da, o muy preferiblemente no mayor que 15 Da.
11. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-10, en el que R^1 se selecciona de halógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 5 átomos C.
12. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1 y 6-7, en el que R^1 es metilo o *terc*-butilo.
13. El derivado de la realización 12, en el que R^1 se halla en posición para.
14. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1 y 6-7, en el que R^1 es -I.
15. El derivado de la realización 14, en el que R^1 se halla en posición para.
16. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que el análogo de GLP-1 tiene un máximo de cinco, preferiblemente un máximo de cuatro, más preferiblemente un máximo de tres, o muy preferiblemente un máximo de dos cambios de aminoácido, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).
17. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-16, en el que el análogo de GLP-1 tiene una amida C-terminal.
18. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-16, en el que el análogo de GLP-1 tiene un grupo -COOH C-terminal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
19. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-18, en el que el análogo de GLP-1 comprende al menos una deleción, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).
20. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-19, en el que uno o dos aminoácidos se han delecionado en el término N del análogo de GLP-1, de tal modo que el análogo comprende preferiblemente des7, des8, o (des7 + des8); más preferiblemente des7, o (des7+des8).
21. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-20, en el que el análogo de GLP-1 es un análogo de GLP-1 (8-37) o GLP-1 (9-37) que tiene hasta 6 residuos de aminoácido cambiados comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1).
22. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-21, en el que el análogo de GLP-1 se selecciona de los siguientes: (i) K^{37}-GLP-1(7-37), (ii) K^{37}-GLP-1(8-37), (iii) K^{37}-GLP-1(9-37), o (iv) un análogo de uno cualquiera de (i)-(iii) que tiene hasta seis cambios de residuos de aminoácido comparado con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1).
23. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 20-21 o 22 (ii)-(iv), en el que se ha añadido un mimético de His o un mimético de His-Ala al nuevo aminoácido N-terminal.
24. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 20-23, en el que un derivado de un imidazol con un grupo ácido carboxílico libre se ha acoplado covalentemente al término N, preferiblemente por formación de un enlace amida entre el grupo ácido carboxílico libre y el grupo amino N-terminal.
25. El derivado de la realización 24, en el que el derivado de imidazol es un imidazol monosustituido.
26. El derivado de la realización 25, en el que el imidazol está sustituido con un radical ácido carboxílico de un alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.
27. El derivado de la realización 26, en el que el radical ácido carboxílico se selecciona de acetilo; y propionilo, butirilo, pentanoílo lineal o ramificado; preferiblemente acetilo.
28. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-27, en el que el residuo de aminoácido en posición 8 del análogo de GLP-1 tiene 3H-imidazol-4-il-acetilo unido a su átomo N.
29. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-28, en el que el residuo de aminoácido en posición 8 del análogo de GLP-1 es alanina.
30. El derivado de la realización 25, en el que el imidazol está sustituido con (metilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (propilcarbamoil)-2-metil-propionilo, o (butilcarbamoil)-2-metil-propionilo.

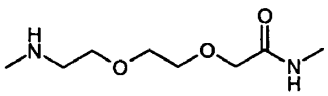
31. El derivado de la realización 30, en el que el imidazol está sustituido con (metilcarbamoil)-2-metil-propionilo, (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo, o (propilcarbamoil)-2-metil-propionilo, preferiblemente con (etilcarbamoil)-2-metil-propionilo.
32. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-31, en el que el residuo de aminoácido en posición 9 del análogo de GLP-1 tiene {2-[2-(1H-imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metil-propionilo} unido a su átomo N.
33. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-32, en el que el residuo de aminoácido en posición 9 del análogo de GLP-1 es ácido glutámico.
34. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-33, que, además de 37K, comprende al menos una de las sustituciones siguientes: 8 Aib; 31H; 34E, Q, R; y/o 38E.
35. El derivado de la realización 34, que comprende 8 Aib.
36. El derivado de la realización 34, que comprende 34E, 34Q, o 34R; preferiblemente 34R.
37. El derivado de la realización 35, que comprende además 34R.
38. El derivado de la realización 34, que comprende 31 H.
39. El derivado de la realización 35, que comprende además 31 H y/o 34Q, preferiblemente ambos.
40. El derivado de la realización 34, que comprende 34R.
41. El derivado de la realización 34, que comprende 38E.
42. El derivado de la realización 37, que comprende además 38E.
43. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-42, en el que los dos restos de fijación de albúmina son similares; con preferencia sustancialmente idénticos; o, muy preferiblemente, idénticos.
44. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-43, en el que los dos restos de prolongación son similares; con preferencia sustancialmente idénticos; o, muy preferiblemente, idénticos.
45. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-44, en el que los dos restos de fijación de albúmina, y/o los dos restos de prolongación tienen un porcentaje de identidad de al menos 80, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, o aún más preferiblemente al menos 95%, o muy preferiblemente al menos 99%.
46. El derivado de la realización 45, en el que el porcentaje de identidad se determina utilizando modelización de datos con el coeficiente de semejanza de Tanimoto y las huellas digitales genéticas de conectividad extendida ECFP_6.
47. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que los restos de fijación de albúmina están unidos al grupo épsilon amino de los residuos lisina en posición 26 y 37, respectivamente, por enlaces amida, opcionalmente por un resto enlazador.
48. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-47, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto enlazador, que está unido en un extremo por un enlace amida, al grupo CO del resto de prolongación, y en el otro extremo está unido, por un enlace amida, al grupo épsilon amino de los residuos lisina en posición 26 y 37, respectivamente.
49. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 47-48 en el que el resto enlazador tiene de 5 a 30 átomos C, preferiblemente de 5 a 25 átomos C, más preferiblemente de 5 a 20 átomos C, o muy preferiblemente de 5 a 17 átomos C.
50. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 47-49 en el que el resto enlazador tiene de 4 a 20 heteroátomos, preferiblemente de 4 a 18 heteroátomos, más preferiblemente de 4 a 14 heteroátomos, o muy preferiblemente de 4 a 12 heteroátomos.
51. El derivado de la realización 50, en el que los heteroátomos son átomos N y/u O.
52. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 47-51 en el que el resto enlazador se selecciona de los siguientes:

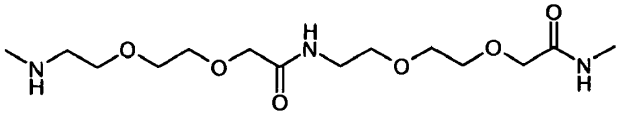
T

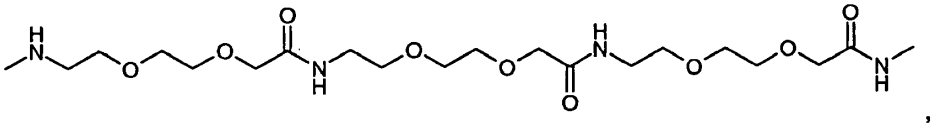

,


,

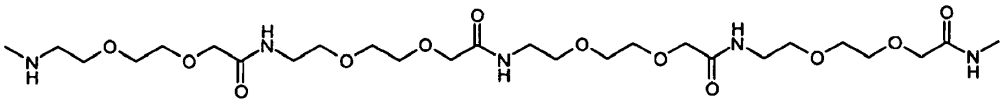



,


,



y



53. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 47-52, en el que el resto enlazador comprende al menos un radical OEG, y/o al menos un radical Glu (ácido glutámico).

54. El derivado de la realización 53, en el que el enlazador está constituido por un radical OEG, o un radical Glu, cuyo grupo ácido gamma-carboxílico forma preferiblemente un enlace amida con el grupo épsilon amino del residuo lisina.

55. El derivado de la realización 53, en el que el enlazador está constituido por dos radicales OEG, o dos radicales Glu, estando interconectados los radicales por enlaces amida, y de tal manera que, preferiblemente, en el caso de dos radicales Glu, el grupo ácido gamma-carboxílico de un Glu forma un enlace amida con el grupo épsilon amino del residuo lisina, o - más preferiblemente "y" - el grupo ácido gamma-carboxílico del otro Glu forma un enlace amida con el grupo amino del primer Glu.

56. El derivado de la realización 53, en el que el enlazador comprende al menos un radical OEG y al menos un radical Glu, preferiblemente uno de cada uno, formando más preferiblemente el extremo carboxi del radical OEG un enlace amida con el grupo épsilon amino del residuo lisina, y formando el extremo amino del radical OEG un enlace amida con el grupo gamma-carboxi del radical Glu.

57. El derivado de la realización 56, en el que el enlazador está constituido por un radical Glu y dos radicales OEG, seleccionados preferiblemente de los siguientes: -Glu-OEG-OEG-, -OEG-Glu-OEG-, y -OEG-OEG-Glu-, en los cuales el grupo amino del radical situado más a la izquierda forma un enlace amida con el resto de prolongación, y el grupo carboxi del radical situado más a la derecha forma un enlace amida con el grupo épsilon amino del residuo lisina, y preferiblemente, en el caso de un radical Glu en el extremo situado más a la derecha, su grupo gamma-carboxi se utiliza para el enlace amida.

58. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-57 que tiene una potencia (CE_{50}) igual a o inferior a 3000 pM, preferiblemente inferior a 3000 pM, más preferiblemente inferior a 2500 pM, aún más preferiblemente inferior a 2000 pM, o muy preferiblemente inferior a 1500 pM.

59. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-58 que tiene una potencia (CE_{50}) inferior a 1000 pM, preferiblemente inferior a 800 pM, más preferiblemente inferior a 600 pM, aún más preferiblemente inferior a 400 pM, o muy preferiblemente inferior a 200 pM.

60. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-59 que tiene una potencia (CE_{50}) inferior a 180 pM, preferiblemente inferior a 160 pM, más preferiblemente inferior a 140 pM, aún más preferiblemente inferior a 120 pM, o muy preferiblemente inferior a 100 pM.

61. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-60 que tiene una potencia (CE_{50}) inferior a 80 pM, preferiblemente inferior a 60 pM, más preferiblemente inferior a 50 pM, aún más preferiblemente igual a o inferior a 40 pM, o muy preferiblemente inferior a 30 pM.

62. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 58-61, en el que la potencia se determina como estimulación de la formación de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, utilizando preferiblemente un linaje de células transfectadas estables tal como BHK467-12A (tK-ts13), y/o utilizando para la determinación de cAMP un ensayo funcional de receptores, v.g. basado en la competición entre cAMP formado endógenamente y cAMP marcado con biotina añadido exógenamente, en cuyo ensayo se captura cAMP más preferiblemente utilizando un anticuerpo específico, y/o en el que un ensayo aún más preferido es el Ensayo de cAMP AlphaScreen, muy preferiblemente el descrito en el Ejemplo 50.

63. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-62, cuya potencia (CE_{50}) es menor que 10 veces la potencia de semaglutida, preferiblemente menor que 8 veces la potencia de semaglutida, más preferiblemente menor que 6 veces la potencia de semaglutida, aún más preferiblemente menor que 4 veces la potencia de semaglutida, o muy preferiblemente menor que dos veces la potencia de semaglutida.

64. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-63, cuya potencia (CE_{50}) es menor que 10 veces la potencia de liraglutida, preferiblemente menor que 8 veces la potencia de liraglutida, más preferiblemente menor que 6 veces la potencia de liraglutida, aún más preferiblemente menor que 4 veces la potencia de liraglutida, o muy preferiblemente menor que dos veces la potencia de liraglutida.

65. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-64, cuya potencia (CE_{50}) es menor que la potencia de liraglutida, preferiblemente menor que 0,8 veces la potencia de liraglutida, más preferiblemente menor que 0,6 veces la potencia de liraglutida, aún más preferiblemente menor que 0,5 veces la potencia de liraglutida, o muy preferiblemente menor que o igual a 0,4 veces la potencia de liraglutida.

66. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-65, para el cual la ratio [afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% de seroalbúmina humana (HSA), dividida por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA] es al menos 1, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20, aún más preferiblemente al menos 30, o muy preferiblemente al menos 40.

67. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-66, para el cual la ratio [afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% de seroalbúmina humana (HSA), dividida por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA] es al menos 50, preferiblemente al menos 60, más preferiblemente al menos 70, aún más preferiblemente al menos 80, o muy preferiblemente al menos 90.

68. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-67, para el cual la ratio [afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% de seroalbúmina humana (HSA), dividida por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA] es al menos 100, preferiblemente al menos 120, más preferiblemente al menos 140, todavía más preferiblemente al menos 160, aún más preferiblemente al menos 180, o muy preferiblemente al menos 200.

69. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-68, cuya afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) se mide por su capacidad para desplazar ^{125}I-GLP-1 del receptor, proporcionándose preferiblemente el receptor en la forma de membranas a partir de un linaje de células estables tal como BHK tk-ts 13 transfectadas con el receptor de GLP-1 humano; y/o la utilización de un ensayo de fijación de SPA, que emplea preferiblemente partículas de SPA tales como glóbulos SPA de aglutinina de germen de trigo, realizándose muy preferiblemente el ensayo de fijación como se describe en el Ejemplo 51.

70. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-69, para el cual la ratio [actividad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% de seroalbúmina humana (HSA), dividida por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA] es al menos igual a la ratio de semaglutida, preferiblemente al menos 50% de la ratio de semaglutida, más preferiblemente al menos 75% de la ratio de semaglutida, o muy preferiblemente al menos igual a la ratio de semaglutida.

71. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-70, para el cual la ratio [afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 2,0% de seroalbúmina humana (HSA), dividida por la afinidad de fijación del receptor de GLP-1 (CI_{50}) en presencia de 0,005% HSA] es al menos igual a la ratio de liraglutida, preferiblemente al menos dos veces la ratio de liraglutida, más preferiblemente al menos 3 veces la ratio de liraglutida, aún más preferiblemente al menos 4 veces la ratio de liraglutida ,o muy preferiblemente al menos 5 veces la ratio de liraglutida.

72. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-71, que tiene una semivida in vitro ($T_{1/2}$) en un extracto de intestino delgado de rata, dividida por la semivida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37) superior a 0,5, preferiblemente superior a 1,0, más preferiblemente superior a 2,0, aún más preferiblemente superior a 3,0, o muy preferiblemente superior a 4,0.

73. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-72, que una semivida in vitro ($T_{1/2}$) en un extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semivida correspondiente ($T_{1/2}$) de GLP-1 (7-37) superior a 5,0, preferiblemente superior a 6,0, más preferiblemente superior a 7,0, o muy preferiblemente superior a 8,0.

74. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 72-73, en el que el extracto de intestino delgado de rata se prepara como se describe en el Ejemplo 57, el derivado se incuba durante 1 hora a 37ºC, se titula la concentración del extracto de tal manera que la semivida de GLP-1 (7-37) está comprendida en el intervalo de 10-20 minutos, v.g. 1,4 µg/ml, las muestras resultantes se realizan por UPLC y/o MALDI-TOF, y/o la incubación y el análisis se realizan como se describe en el Ejemplo 57.

75. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-74, para el cual una ratio [semivida ($T_{1/2}$) in vitro en el extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semivida ($T_{1/2}$) in vitro en el extracto de intestino delgado de rata de GLP-1 (7-37)] es al menos 0,5 veces la ratio correspondiente de semaglutida, preferiblemente al menos dos veces la ratio de semaglutida, más preferiblemente al menos 3 veces la ratio de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 5 veces la ratio de semaglutida, o muy preferiblemente al menos 7 veces la ratio de semaglutida.

76. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-75, para el cual una ratio [semivida ($T_{1/2}$) en el extracto de intestino delgado de rata, dividida por una semivida ($T_{1/2}$) en el extracto de intestino delgado de rata de GLP-1 (7-37)] es al menos 0,1 veces la ratio correspondiente de liraglutida, preferiblemente al menos 0,4 veces la ratio de liraglutida, más preferiblemente al menos 0,8 veces la ratio de liraglutida, aún más preferiblemente al menos 1,2 veces la ratio de liraglutida, o muy preferiblemente al menos 1,5 veces la ratio de liraglutida.

77. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-75, que tiene una semivida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. de al menos 4 horas, preferiblemente al menos 6 horas, aún más preferiblemente al menos 8 horas, o muy preferiblemente al menos 10 horas.

77. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-76, que tiene una semivida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. de al menos 12 horas, preferiblemente al menos 15 horas, aún más preferiblemente al menos 18 horas, o muy preferiblemente al menos 20 horas.

78. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 76-77, en el que las ratas son ratas macho Sprague Dawley con un peso corporal de 300 a 600 g.

79. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-78, que tiene una semivida ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de administración i.v. que es al menos igual que la semivida de semaglutida, preferiblemente al menos dos veces la semivida de semaglutida, más preferiblemente al menos 3 veces la semivida de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 4 veces la semivida de semaglutida, o muy preferiblemente al menos 5 veces la semivida de semaglutida.

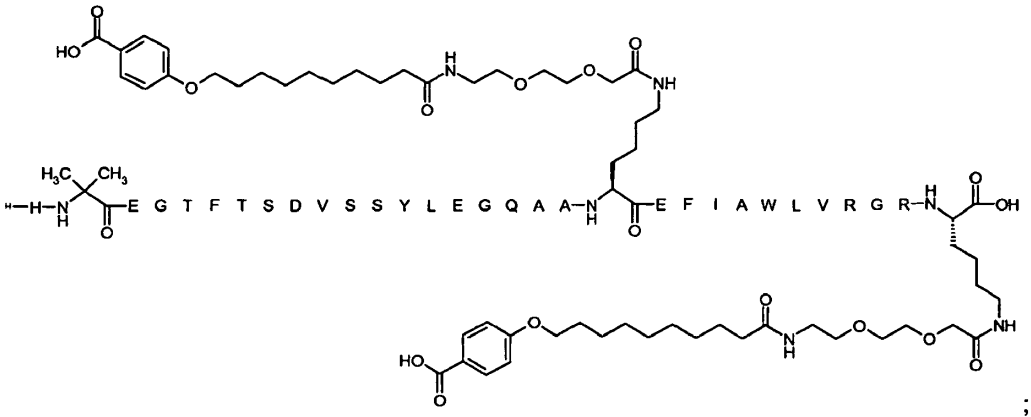
80. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-79, que tiene una semivida ($T_{1/2}$) in vivo en lechones después de administración i.v. de al menos 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 36 horas, aún más preferiblemente al menos 48 horas, o muy preferiblemente al menos 60 horas.

81. El derivado de la realización 80, en el que los lechones son lechones macho Göttingen.

82. El derivado de una cualquiera de las realizaciones 1-81, que tiene una semivida ($T_{1/2}$) in vivo en lechones después de administración i.v. que es al menos 0,2 veces la semivida de semaglutida, preferiblemente al menos 0,4 veces la semivida de semaglutida, más preferiblemente al menos 0,6 veces la semivida de semaglutida, aún más preferiblemente al menos 0,8 veces la semivida de semaglutida, o muy preferiblemente al menos igual que la semivida de semaglutida.

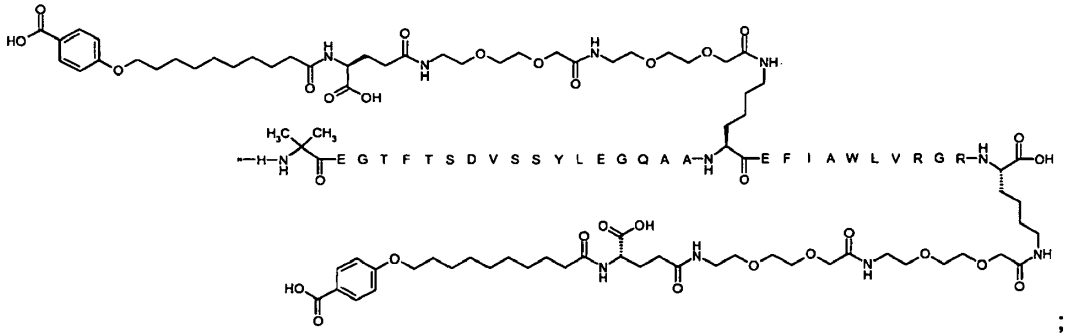
83. Un derivado de GLP-1 seleccionado de lo siguiente:

(i) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]etoxi}etoxi)acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



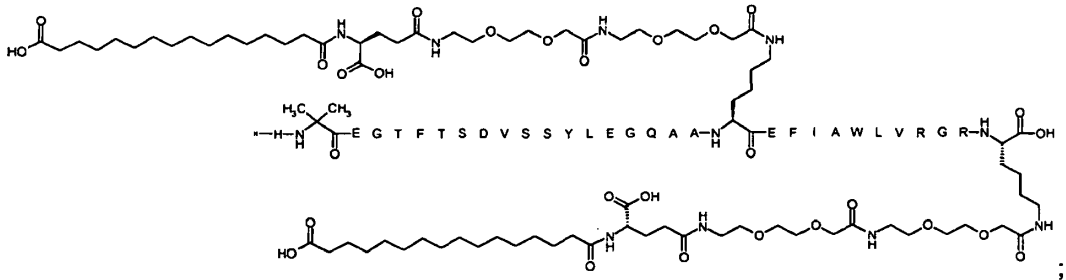
;

(ii) $N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi] acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



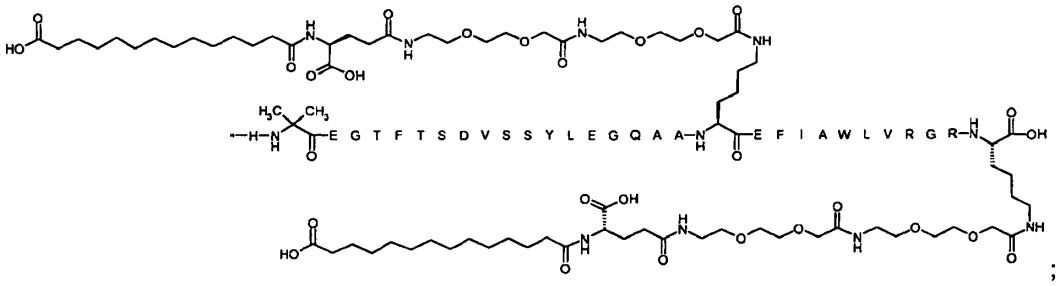
;

(iii) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)-acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



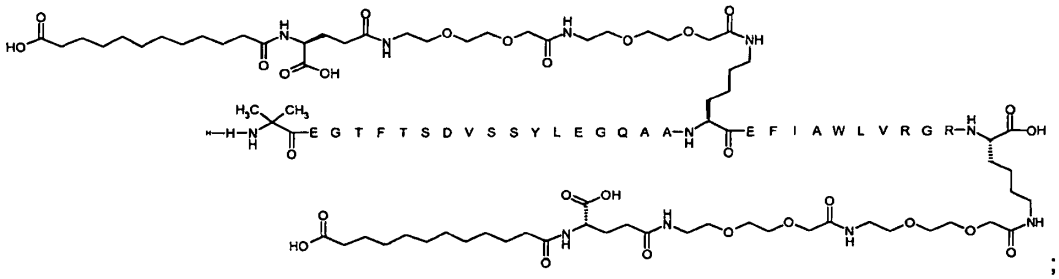
;

(iv) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37)



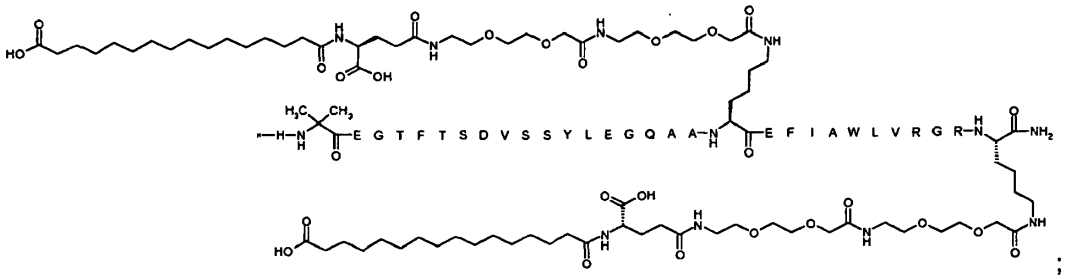
;

(v) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



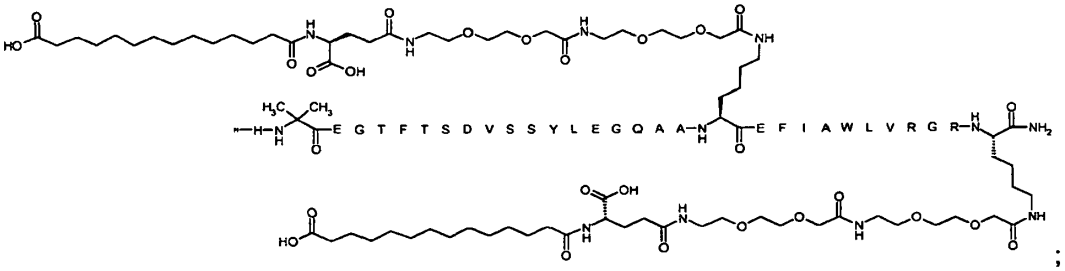
;

(vi) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)-acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amide:



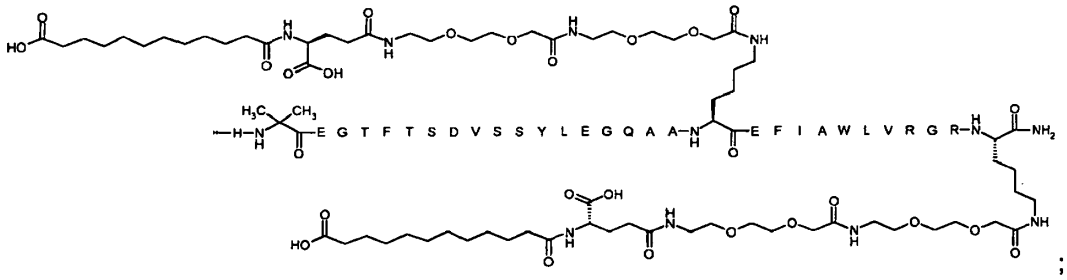
;

(vii) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amide:



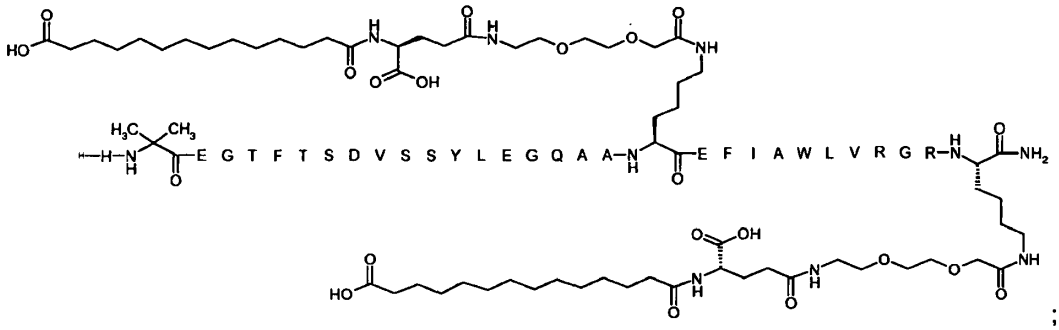
;

(iix) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida:



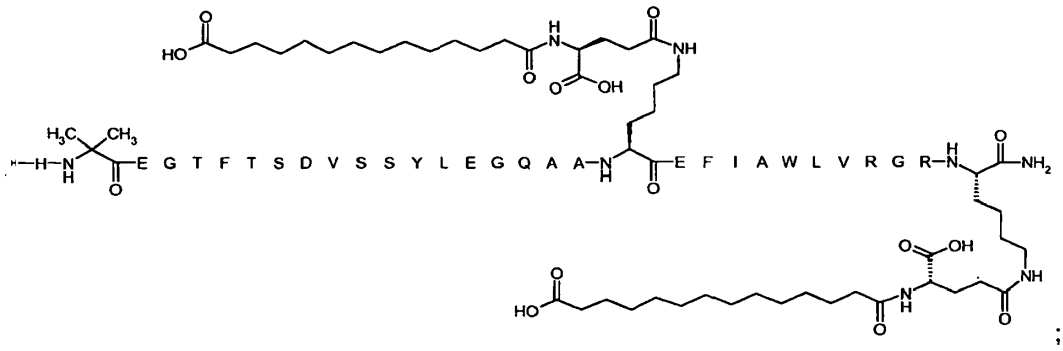
;

(ix) $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida:



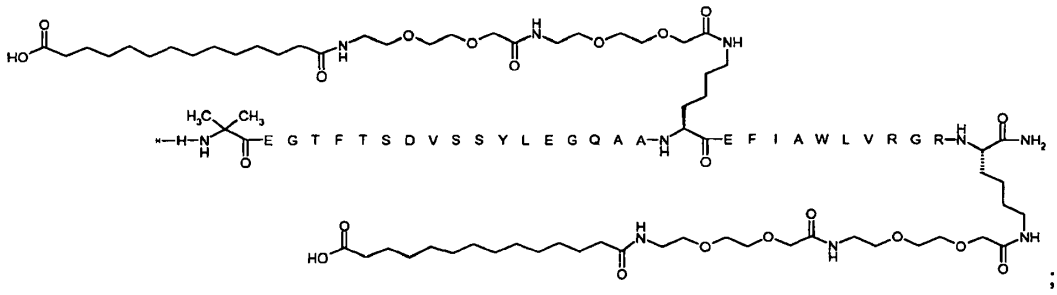
;

(x) $N^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]], $N^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxi-tridecanoilamino)butirilamino]][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida:



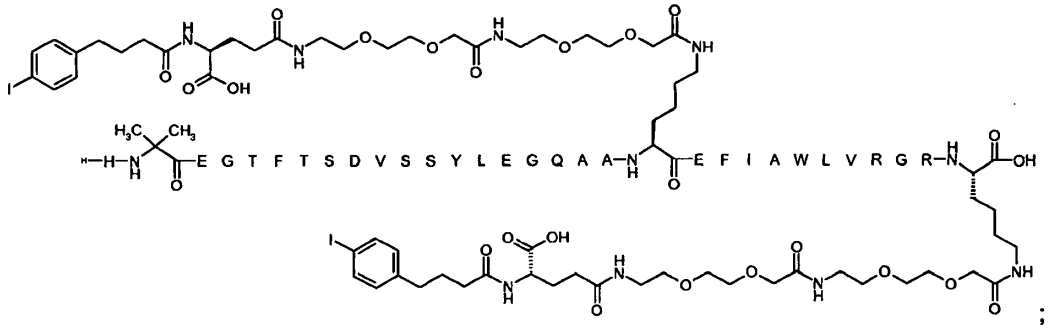
;

(xi) $N^{\varepsilon 26}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)etoxi]etoxi}acetilamino)etoxi]etoxi}acetil), $N^{\varepsilon 37}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)etoxi]etoxi}acetilamino)etoxi]etoxi}acetil)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida:



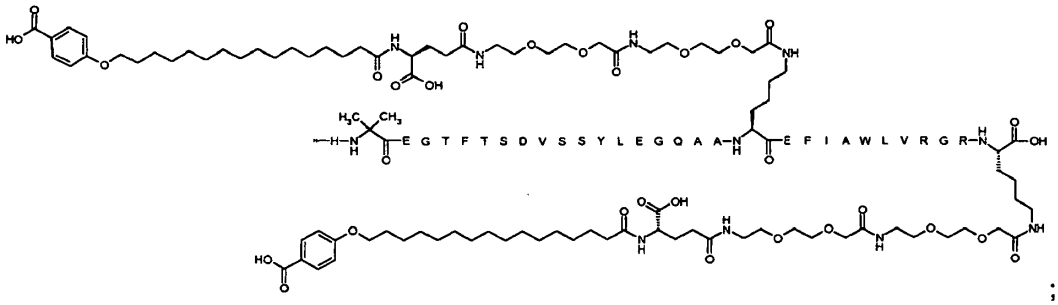
;

(xii) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)4-carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



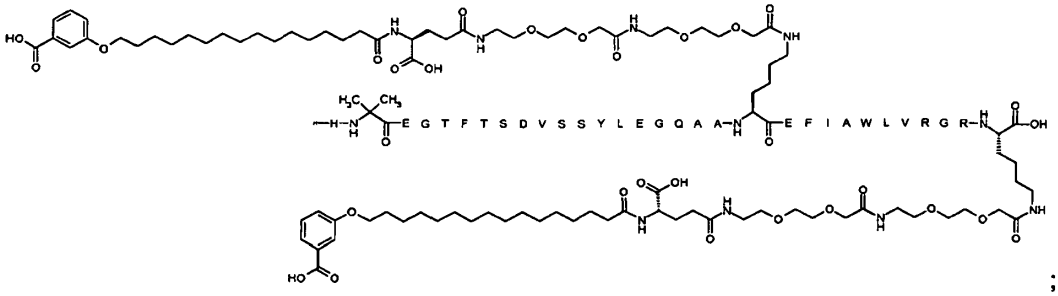
;

(xiii) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[16-(4-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[16-(4-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butiril-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



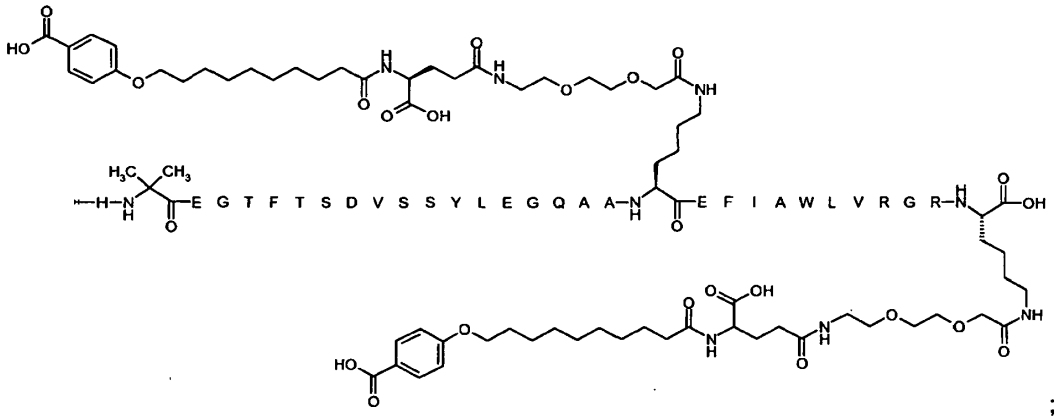
;

(xiv) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[16-(3-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[16-(3-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butiril-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



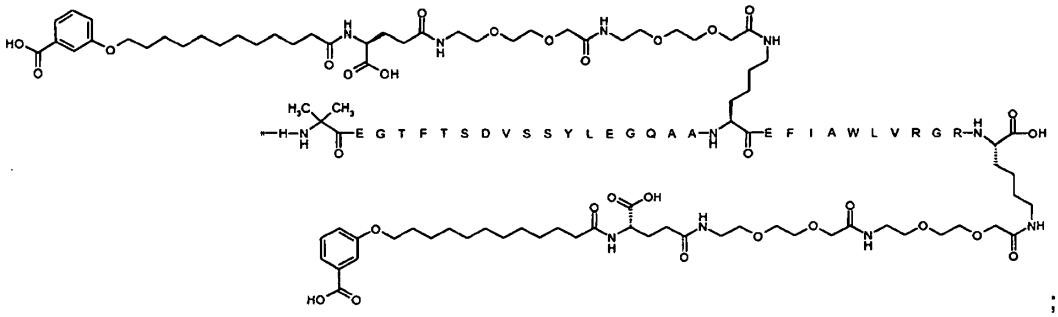
;

(xv) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)-etoxi]acetil}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butirilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



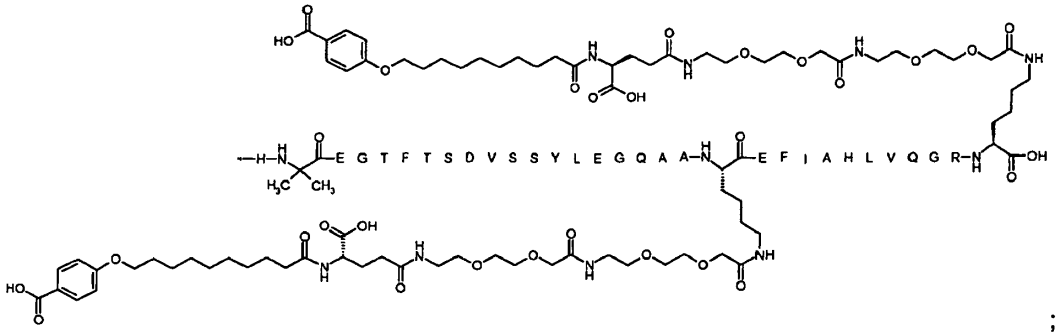
;

(xvi) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]-acetil-amino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37:



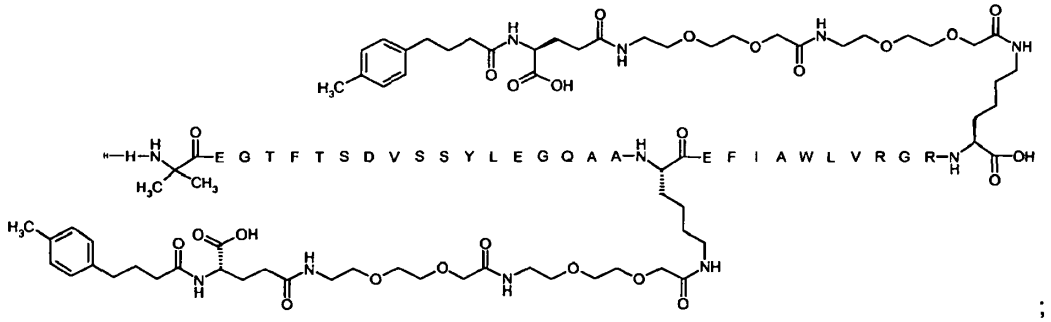
;

(xvii) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi)acetil]-$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]-acetilamino) etoxi]etoxi)acetil][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



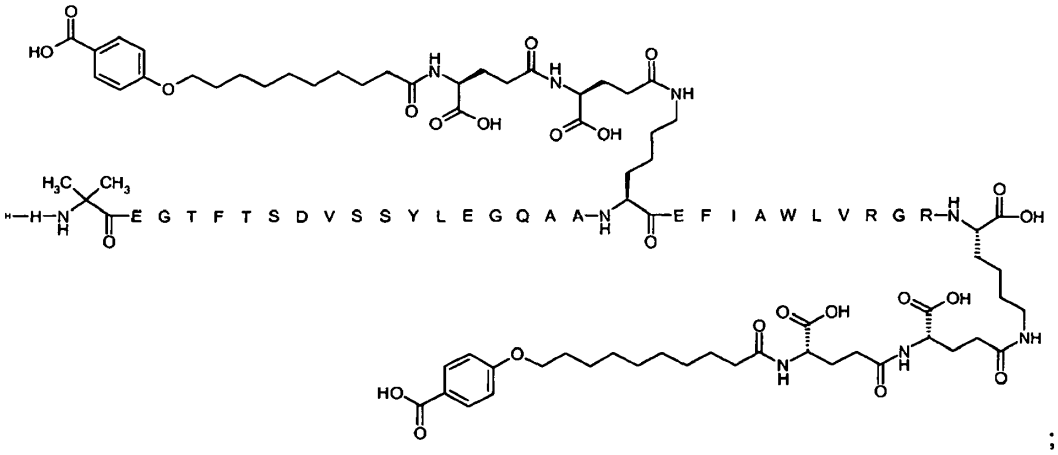
;

(iixx) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-metilfenil)butirilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[4-(4-metilfenil)butirilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}-etoxi)etoxi]acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



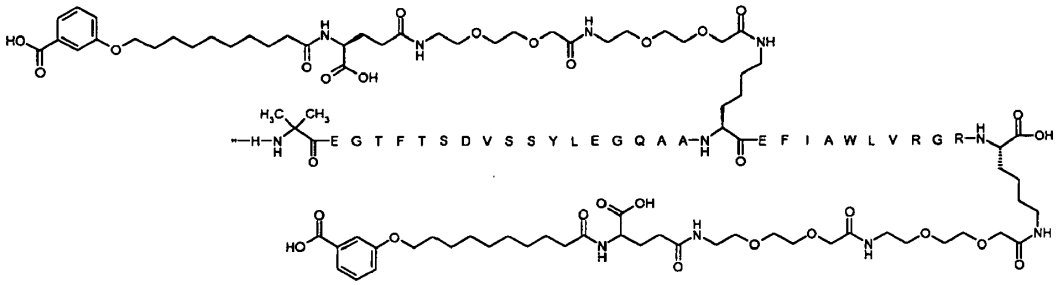
;

(ixx) $N^{\varepsilon 26}$-((S)-4-carboxi-4-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril), $N^{\varepsilon 37}$-((S)-4-carboxi-4-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):

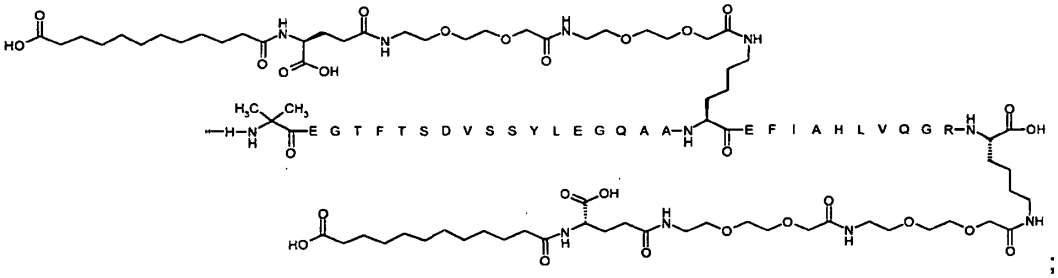


;

(xx) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetil} [Aib^{8}Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):

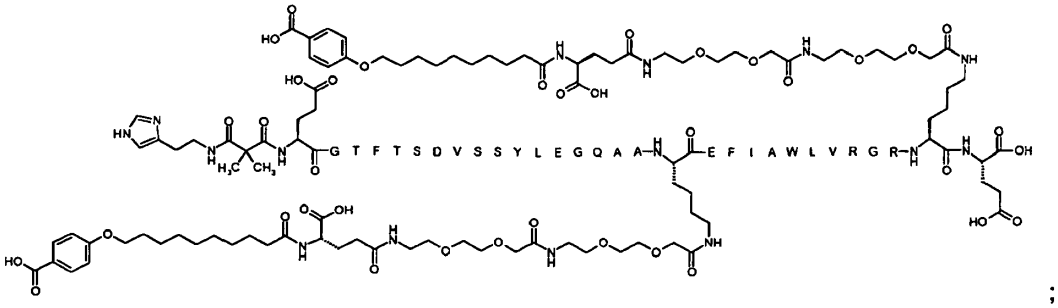


(xxi) $N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



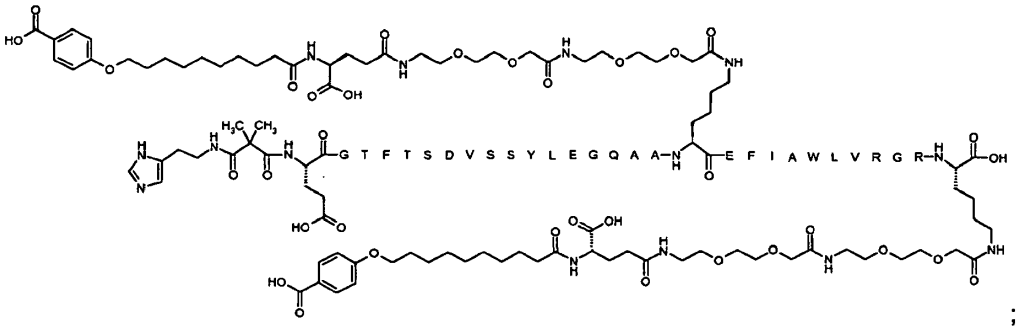
;

(xxii) N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)etilcarbamoil]-2-metilpropionil},$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino] butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil} [Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37)Glu^{38}:



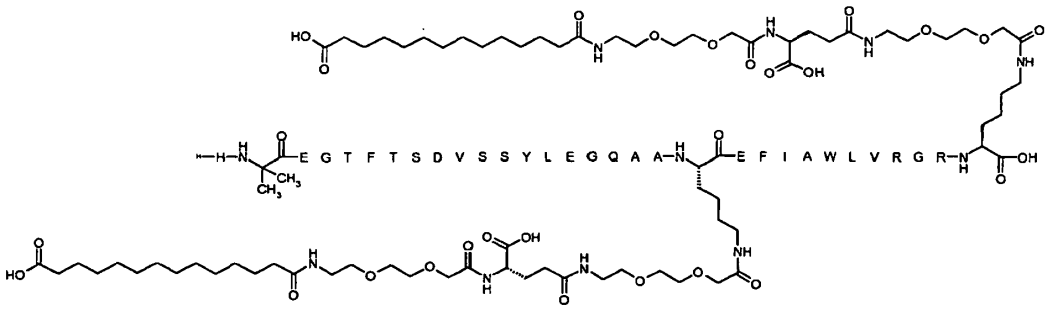
;

(xxiii) N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)etilcarbamoil]-2-metilpropionil}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil} [Arg^{34}, Lys^{37}] -péptido GLP-1(9-37):



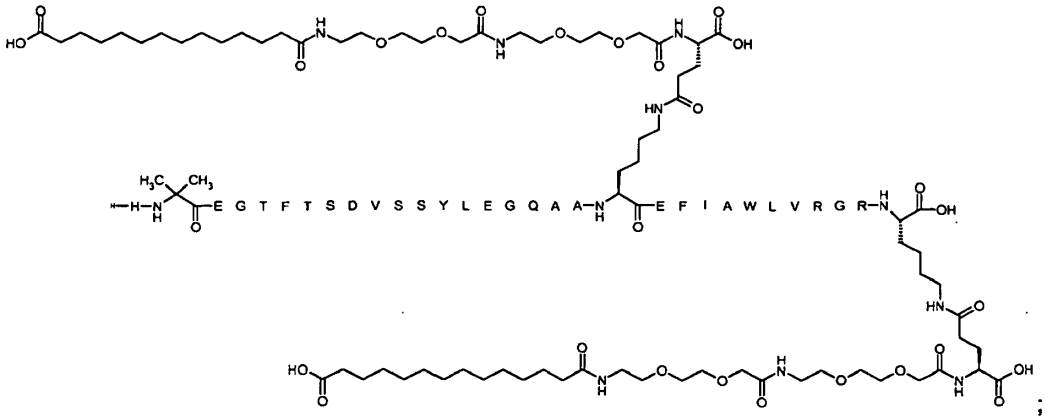
;

(xxiv) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)] etoxi}etoxi)acetilamino]butirilamino}etoxi) etoxi] acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]-butiril-amino} etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



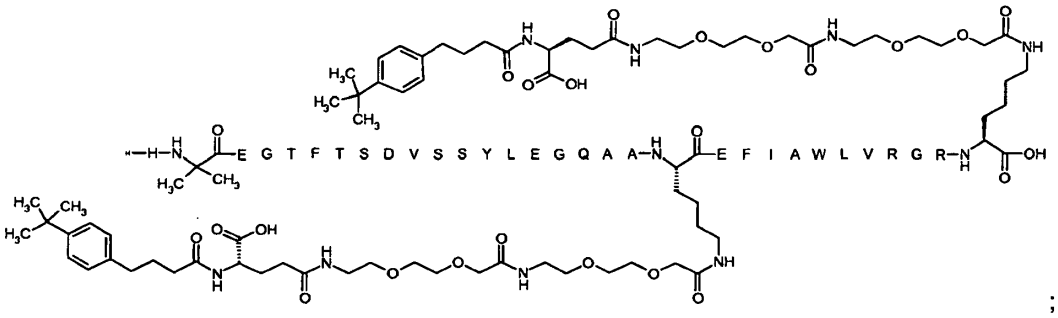
;

(xxv) $N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi] acetilamino}butiril],$N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi)-etoxi] acetilamino}butiril][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



;

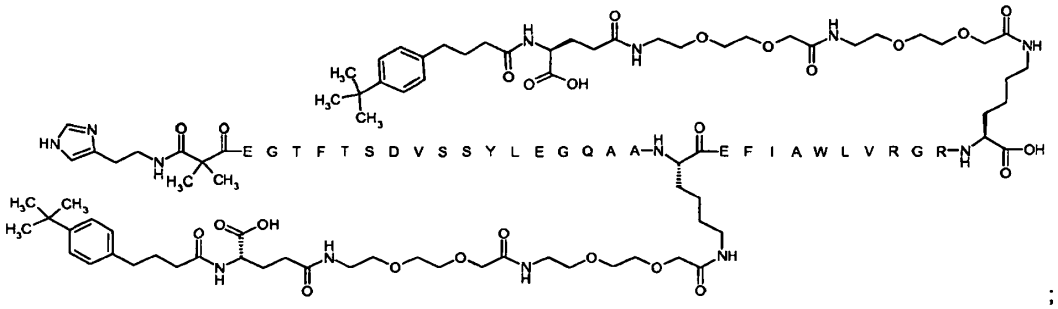
(xxvi) $N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butil-fenil)-butirilamino]-4-carboxi-butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butil-fenil)-butirilamino]-4-carboxi-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37):



;

y

(xxvii) N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metilpropionil}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butilfenil)-butirilamino]-4-carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butilfenil)butirilamino]-4-carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37):



;

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los derivados (i)-(xxvii).

84. Un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-83 para uso como medicamento.

85. Un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-83, para uso en el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

86. Un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-83, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

87. Un método de tratamiento y prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética, por administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado conforme a una cualquiera de las realizaciones 1-83.

EJEMPLOS

Esta parte experimental comienza con una lista de abreviaturas, y va seguida por una sección que incluye métodos generales para síntesis y caracterización de los análogos y derivados de la invención. Siguen luego varios ejemplos que se refieren a la preparación de derivados específicos de GLP-1, y al final se han incluido cierto número de ejemplos relativos a la actividad y propiedades de estos análogos y derivados (sección titulada Métodos farmacológicos).

Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Abreviaturas

Las abreviaturas siguientes se utilizan a continuación, por orden alfabético:

Aib:	ácido aminoisobutírico (ácido α-aminoisobutírico)
API:	Ingrediente Farmacéutico Activo
AUC:	Área bajo la Curva
BG:	Glucosa en Sangre
BHK:	Riñón de Cría de Hamster

BW: Peso Corporal
Bom: Benciloximetilo
Boc: *t*-butiloxicarbonilo
BSA: Seroalbúmina Bovina
Bzl: Bencilo
Clt: 2-clorotritilo
collidine: 2,4,6-trimetilpiridina
DCM: Diclorometano
Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
DIC: diisopropilcarbodiimida
DIPEA: diisopropiletilamina
DMAP: 4-dimetilaminopiridina
DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
EDTA: ácido etilenodiaminatetraacético
EGTA: ácido etilenglicol-tetraacético
FCS: Suero de Ternero Fetal
Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU: (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-hexafluorofosfato de 1,1,3,3-tetrametiluronio)
HBTU: (2-(1H-benzotriazol-1-il)-hexafluorofosfato de 1,1,3,3-tetrametiluronio)
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol o hexafluoroisopropanol
HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSA: Seroalbúmina Humana
IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
Imp: Ácido Imidazopropiónico (al que se hace referencia también como des-aminohistidina, DesH)
i.v. vía intravenosa
ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
IVGTT: Test de Tolerancia Intravenosa a la Glucosa
LCMS: Cromatografía Líquida-Espectroscopía de Masas
LYD: Landrace Yorkshire Duroc
MALDI-MS: Véase MALDI-TOF MS
MALDI-TOF MS: Espectroscopía de Masas Laser Asistida por Matriz Desorción/Ionización con Analizador de Tiempo de Vuelo
MeOH: metanol
Mmt: 4-metoxitritilo
Mtt: 4-metiltritilo
NMP: N-metilpirrolidona
OBz: benzoiléster
OEG: ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanooico
OPfp: pentafluorofenoxi
OPnp: para-nitrofenoxi
OSu: O-succinimidil-ésteres (ésteres de hidroxisuccinimida)
OSuc: 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo
OtBu: terc-butil éster
Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato
PD: Farmacodinámico
Pen/Strep: Penicilina/Estreptomicina
PK: Farmacocinético
RP: Fase Inversa
RP-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Inversa
RT: Temperatura Ambiente
Rt: Tiempo de Retención
s.c.: Subcutáneamente
SD: Desviación Estándar
SEC-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión por Tamaños
SEM: Error estándar del valor medio
SPA: Ensayo de proximidad de centelleo
SPPS: Síntesis de Péptidos en Fase Sólida
tBu: tertc.butilo
TFA: ácido trifluoroacético
TIS: triisopropilsilano
TLC: Cromatografía en Capa Fina
Tos: tosilato (o para-toluenesulfonilo)

Tris: tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Trt: trifenilmetilo o tritilo
Trx: Ácido tranexámico
UPLC: Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

A. Métodos generales

Esta sección se refiere a métodos para síntesis de péptidos en fase sólida (métodos SPPS, que incluyen métodos para desprotección de aminoácidos, métodos para escisión del péptido de la resina, y para su purificación), así como métodos para detección y caracterización del péptido resultante (métodos LCMS, MALDI, y UPLC). La síntesis de péptidos en fase sólida puede mejorarse en algunos casos por el uso de di-péptidos protegidos en el enlace amida del di-péptido con un grupo que puede escindirse en condiciones ácidas tal como, pero sin carácter limitante, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo, o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente en el péptido una serina o una treonina, pueden utilizarse di-péptidos de seudoprolina (disponibles de, v.g. Novabiochem, véase también W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403). Los derivados de aminoácido protegidos utilizados eran Fmoc-aminoácidos estándar (suministrados v.g. por Anaspec, IRIS, o Novabiochem). El aminoácido N-terminal estaba protegido con Boc en el grupo alfa-amino (v.g. Boc-His(Boc)-OH, o Boc-His(Trt)-OH para péptidos con His en el término N). El grupo épsilon-amino de las lisinas en la secuencia estaba protegido con Mtt, Mmt, Dde, ivDde, o Boc, dependiendo de la ruta para unión al resto de fijación de albúmina y el espaciador. El resto de fijación de albúmina y/o el enlazador pueden estar unidos al péptido por acilación del péptido unido a la resina o por acilación en solución del péptido no protegido. En el caso de unión del resto de fijación de albúmina y/o el enlazador a la resina peptídica protegida, la unión puede ser modular utilizando SPPS y bloques de construcción convenientemente protegidos tales como, pero sin carácter limitante, Fmoc-Oeg-OH (ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico), Fmoc-Trx-OH (ácido Fmoc-tranexámico), Fmoc-Glu-OtBu, mono-terc-butiléster de ácido octadecanodioico, éster mono-terc-butílico de ácido nonadecanodioico, o éster terc-butílico de ácido 4-(9-carboxinoniloxi)-benzoico.

1. Síntesis del péptido unido a resina

SPPS método A

El método SPPS A se refiere a la síntesis de una resina peptídica protegida utilizando química de Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 (designado también sintetizador ABI433A) en escala de 0,25 mmol o 1,0 mmol utilizando los protocolos del fabricante UV FastMoc que emplean acoplamientos mediados por HBTU o HATU en NMP, y monitorización UV de la desprotección del grupo protector Fmoc.
La resina de partida utilizada para la síntesis de amidas peptídicas era una resina de Amida Rink adecuada (para amidas peptídicas), o (para péptidos con un término C carboxi) una resina Wang adecuada o una resina adecuada de clorotritilo. Resinas adecuadas están disponibles comercialmente de, v.g., Novabiochem.

SPPS método B

El método SPPS B se refiere a la síntesis de una resina peptídica protegida utilizando química Fmoc en un sintetizador de péptidos Liberty basado en microondas (CEM Corp., Carolina del Norte). Una resina adecuada es una resina Wang precargada, de carga baja, disponible de Novabiochem (v.g. Fmoc-Lys (Mtt)-resina Wang de carga baja, 0,35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó con 5% de piperidina en NMP a una temperatura de hasta 70 ó 75ºC. La química de acoplamiento era DIC/HOAt en NMP. Se añadieron a la resina soluciones aminoácido/HOAt (0,3 M en NMP con un exceso molar de 3-10 veces), seguido por el mismo equivalente molar de DIC (0,75 M en NMP). Por ejemplo, se utilizaron las cantidades siguientes de aminoácido 0,3 m/solución de HOAt por acoplamiento para las reacciones en escala siguientes: Escala/ml, 0,10 mmol/2,5 ml, 0,25 mmol/5 ml, 1 mmol/15 ml. Los tiempos y temperaturas de acoplamiento eran generalmente 5 minutos a hasta 70 ó 75ºC. Se utilizaron tiempos de acoplamiento más largos para las reacciones en mayor escala, por ejemplo 10 min. Los aminoácidos de histidina se acoplaron doblemente a 50ºC, o se acoplaros cuatro veces si el aminoácido anterior estaba estéricamente impedido (v.g., Aib). Los aminoácidos de arginina se acoplaron a RT durante 25 min, y se calentaron luego a 70 ó 75ºC durante 5 min. Algunos aminoácidos tales como, pero sin carácter limitante Aib, se "acoplaron doblemente", lo que significa que después del primer acoplamiento (v.g. 5 min a 75ºC), la resina se escurre y se añaden más reactivos (aminoácido, HOAt y DIC), y la mixtura se calienta de nuevo (v.g. 5 min a 75ºC). Cuando se deseaba una modificación química de una cadena lateral lisina, la lisina se incorporaba como Lys (Mtt). El grupo Mtt se eliminó por lavado de la resina con DCM y suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol puro (sin diluir) durante 20 minutos seguido por lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó por síntesis manual (véase SPPS, método D) o por uno o más pasos automáticos en el sintetizador de péptidos Liberty como se ha descrito arriba, utilizando bloques de construcción protegidos adecuadamente (véase Métodos Generales), que incluían opcionalmente un acoplamiento manual.

Método SPPS D

El método SPPS D se refiere a síntesis de la resina peptídica protegida utilizando química de Fmoc manual. Ésta se utilizó típicamente para la unión de los enlazadores y cadenas laterales a la cadena principal del péptido. Se emplearon las condiciones siguientes en la escala de síntesis de 0,25 mmol. La química de acoplamiento era DIC/HOAt/colidina en NMP con un exceso molar de 4-10 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron 1-6 h a la temperatura ambiente. La desprotección de Fmoc se realizó con 20-25% de piperidina en NMP (3 x 20 ml, cada una 10 min) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml). La desprotección de Dde- o ivDde se realizó con 2% de hidracina en NMP (2 x 20 ml, cada uno 10 min) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml). La desprotección de Mtt o Mmt se realizó con 2% TFA y 2-3% TIS en DCM (5 x 20 ml, cada uno 10 min) seguido por DCM (2 x 20 ml), 10% MeOH y 5% de DIPEA en DCM (2 x 20 ml) y lavados con NMP (4 x 20 ml), o por tratamiento con hexafluoroisopropanol puro (5 x 20 ml, cada uno 10 min) seguido por lavados como en el caso anterior. El resto de fijación de albúmina y/o el enlazador pueden unirse al péptido sea por acilación del péptido unido a la resina o acilación en solución del péptido sin proteger (véase las rutas descritas más adelante). En el caso de unión del resto de fijación de albúmina y/o el enlazador a la resina peptídica protegida, la unión puede ser modular utilizando SPPS y bloques de construcción protegidos convenientemente (véase Métodos Generales).

Fijación al péptido unido a resina - Ruta I: Un resto o enlazador de fijación de albúmina activado (éster activo o anhídrido simétrico) tal como mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido octadecanodioico (Ebashi et al., EP 511600, 4 equivalentes molares con relación a péptido unido a la resina) se disolvió en NMP (25 ml), se añadió a la resina y se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. La mixtura de reacción se filtró y la resina se lavó a fondo con NMP, DCM, 2-propanol, metanol y dietil-éter.

Fijación al péptido unido a resina - Ruta II: El resto de fijación de albúmina se disolvió en NMP/DCM (1:1, 10 ml). Se añadió el reactivo de activación tal como HOBt (4 equivalentes molares con relación a resina) y DIC (4 equivalentes molares con relación a resina) y la solución se agitó durante 15 min. La solución se añadió a la resina y se añadió7 DIPEA (4 equivalentes molares con relación a resina). La resina se agitó con sacudidas dos a 24 horas a la temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2 x 20 ml), NMP/DCM (1:1, dos x 20 ml) y DCM (2 x 20 ml).

Fijación al péptido en solución - Ruta III: Un resto o enlazador de fijación de albúmina activado (éster activo o anhídrido simétrico) tal como mono(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)-éster de ácido octadecanodioico (Ebashi et al., EP 511600), 1-1,5 equivalentes molares con relación al péptido se disolvió en un disolvente orgánico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mixtura de agua/disolvente orgánico (1-2 ml) y se añadió a una solución del péptido en agua (10-20 ml) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de grupos protectores en el residuo de fijación de albúmina tales como *terc*-butilo, la mixtura de reacción se liofilizó durante una noche y el péptido bruto aislado se desprotegió después de ello. En el caso de grupos protectores *terc*-butilo, la desprotección se realizó disolviendo el péptido en una mixtura de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 min, la mixtura se evaporó a vacío y el péptido bruto se purificó por HPLC preparativa como se describe más adelante.

SPPS, Método E

El método SPPS E se refiere a la síntesis de péptidos por química Fmoc en un Sintetizador de Péptidos en Fase Sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714, EE.UU.). Una resina adecuada se carga previamente, resina Wang de carga baja disponible de Novabiochem (v.g., resina Wang Fmoc-Lys (Mtt) de carga baja, 0,35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 25% en NMP durante dos x 10 min. La química de acoplamiento era DIC/HOAt/colidina en NMP. Se añadieron a la resina soluciones de aminoácido/HOAt (0,3 M en NMP con un exceso molar de 3-10 veces), seguidas por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) y colidina (3 M en NMP). Por ejemplo, se utilizaron las cantidades siguientes de aminoácido 0,3 m/solución de HOAt por acoplamiento para las reacciones en escala siguientes: Escala/ml, 0,10 mmol (2,5 ml, 0,25 mmol/5 ml. Los tiempos de acoplamiento eran generalmente 60 minutos. Algunos aminoácidos que incluían, pero sin carácter limitante, arginina, Aib o histidina se "acoplaron doblemente ", lo que significa que después del primer acoplamiento (v.g. 60 min), la resina se escurrió y se añadieron más reactivos (aminoácido, HOAt, DIC y colidina), y la mixtura se dejó reaccionar de nuevo (v.g. 60 min). Algunos aminoácidos y derivados de ácidos grasos que incluían, pero sin carácter limitante Fmoc-Oeg-OH, Fmoc-Trx-OH, Fmoc-Glu-OtBu, mono-terc-butil-éster de ácido octadecanodioico, mono-terc-butiléster de ácido nonadecanodioico, o terc-butil-éster de ácido 4-(9-carboxinoniloxi)-benzoico se acoplaron durante un tiempo prolongado, por ejemplo 6 horas. Cuando se deseaba una modificación química de una cadena lateral lisina, la lisina se incorporó como Lys (Mtt). El grupo Mtt se retiró por lavado de la resina con DCM y suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol/DCM (75:25) durante 3 x 10 minutos seguido por lavados con DCM, 20% piperidina y NMP. La modificación química de la resina se realizó por síntesis manual (véase SPPS método D) o por uno o más pasos automáticos en el sintetizador de péptidos Prelude como se ha descrito arriba utilizando bloques de construcción protegidos convenientemente (véase Métodos Generales).

2. Escisión del péptido de la resina y purificación

Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM, y el péptido se escindió de la resina por un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5 ó 92,5/5/2,5) seguido por precipitación con éter dietílico. El péptido se disolvió en un disolvente adecuado (tal como, v.g., 30% ácido acético) y se purificó por RP-HPLC estándar en una columna C18, 5 µM, utilizando acetonitrilo/agua/TFA. Las fracciones se analizaron por una combinación de métodos UPLC, MALDI y LCMS, y las fracciones apropiadas se agruparon y liofilizaron.

3. Métodos para detección y caracterización

Métodos LCMS

Método LCMS1 (LCMS1)

Se utilizó un espectrómetro de masas Agilent Technologies (LC/MSD TOF (G1969A) para identificar la masa de la muestra después de elución de un sistema HPLC serie Agilent1200. La simplificación de los espectros de proteínas se calculó con el software de confirmación de proteínas de Agilent.
Eluyentes:

A: Ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
B: Ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo
Columna: Zorbax 5u, 300 SB-C3, 4,8 x 50 mm
Gradiente: Acetonitrilo 25%-95% durante 15 min

LCMS Método dos (LC-MS2)

Se utilizó un espectrómetro de masas Perkin Elmer Sciex API 3000 para identificar la masa de la muestra después de elución de un sistema Perkin Elmer series 200 HPLC.
Eluyentes:
A: Ácido trifluoroacético al 0,05% en agua
B: Ácido trifluoroacético al 0,05% en acetonitrilo
Columna: Waters XTerra MS C18 X 3 mm d.i. 5 µm
Gradiente: Acetonitrilo 5%-90% durante 7,5 min a 1,5 ml/min

LCMS Método 3 (LCMS3)

Se utilizó un espectrómetro de masas Waters Micromass ZQ para identificar la masa de la muestra después de elución de un sistema Waters Alliance HT HPLC.
Eluyentes:

A: Ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
B: Ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo
Columna: Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4,60 mm, i.d. 5 µm
Gradiente: 10%-90% de B durante 7,5 min a 1,0 ml/min

LCMS Método 4 (LCMS4)

Se realizó la LCMS4 en un equipo constituido por un sistema Waters Acquity UPLC y espectrómetro de masas LCT Premier XE de Micromass. La bomba de UPLC estaba conectada a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: Ácido fórmico al 0,1% en agua
B: Ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo

El análisis se realizó a RT por inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente dos x 10 µl) en la columna que se eluyó con un gradiente de A y B. Las condiciones de UPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas eran:
Columna Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm
Gradiente: Lineal 5%-95% de acetonitrilo durante 4,0 min (alternativamente 8,0 min) a 0,4 ml/min
Detección: 214 nm (salida análoga a partir de TUV (detector UV sintonizable))
Modo de ionización MS: API-ES
Escáner: 100-2000 amu (alternativamente 500-2000 amu), paso 0,1 amu

MÉTODOS UPLC Y HPLC

Método 05 B5 1

UPLC (método 05_B5_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: Na_2SO_4 0,2 M, H_3PO_4 0,04 M, CH_3CN 10% (pH 3,5)
B: 70% CH_3CN 30% H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 60% A, 40% B a 30% A, 70% B durante 8 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 05 B7 1

UPLC (método 05_B7_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: Na_2SO_4 0,2 M, H_3PO_4 0,04 M, CH_3CN 10% (pH 3,5)
B: 70% CH_3CN 30% H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 80% A, 20% B a 40% A, 60% B durante 8 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 04 A2 1

UPLC (método 04_A2_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: 90% H_2O, 10% CH_3CN, bicarbonato de amonio /0,25 M
B: 70% CH_3CN, 30% H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 90% A, 10% B a 60% A, 40% B durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 04 A3 1

UPLC (método 04_A3_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. UV detections at 214nm y 254nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7um, 2,1 mm x 150 mm, a 40°C. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: 90 % H_2O, 10 % CH_3CN, bicarbonato de amonio 0,25 M
B: 70 % CH_3CN, 30 % H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 75 % A, 25 % B a 45 % A, 55 % B durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 04 A4 1

UPLC (método 04_A4_1): The RP-análisis se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron utilizando un ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm column, 40 °C. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: 90 % H_2O, 10 % CH_3CN, bicarbonato de amonio 0,25 M
B: 70 % CH_3CN, 30 % H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 65 % A, 35 % B a 25 % A, 65 % B durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 08 B2 1

UPLC (método 08_B2_1): The RP-análisis se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron utilizando un ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1.7um, 2.1 mm x 150 mm column, a 40°C. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: 99.95 %H_2O, 0.05 % TFA
B: 99.95 % CH_3CN, 0.05 % TFA

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 95 % A, 5 % B a 40 % A, 60 % B durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 08 B4 1

UPLC (método 08_B4_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7um, 2,1 mm x 150 mm , a 40°C. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: 99,95 %H_2O, 0,05 % TFA
B: 99,95 % CH_3CN, 0,05 % TFA

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 95 % A, 5 % B a 95 % A, 5 % B durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 05 B10 1

UPLC (Método 05_B10_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7um, 2,1 mm x 150 mm , a 40°C. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: Na_2SO_4 0,2 M, H_3PO_4 0,04 M, 10 % CH_3CN (pH 3,5)
B: 70 % CH_3CN, 30 % H_2O

Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 40 % A, 60 % B a 20 % A, 80 % B durante 8 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 01 A4 2

UPLC (método 01_A4_2): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters 600S provisto de un detector de red de diodos Waters 996. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna Symmetry 300 C18, 5 um, 3,9 mm x 150 mm, 42ºC. El sistema HPLC estaba conectado a tres depósitos de eluyente que contenían: A: 100% H_2O, B: 100% CH_3CN; C: ácido trifluoroacético al 1% en H_2O. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 90% A, 5% B, 5% C hasta 0% A, 95% B, 5% C durante 15 minutos a un caudal de 1,0 ml/min.

Método 09 B2 1

UPLC (método 09_B2_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían: A: 99,95% H_2O, 0,05% TFA; B: 99,95% CH_3CN, 0,05% TFA. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 95% A, 5% B a 40% A, 60% B, durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 09 B4 1

UPLC (método 09_B4_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían: A: 99,95% H_2O, 0,05% TFA; B: 99,95% CH_3CN, 0,05% TFA. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 95% A, 5% B a 5% A, 95% B, durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 05 B8 1

UPLC (método 05_B8_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Se recogieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían: A: H_2O 0,2 M, H_3PO_4 0,04 M, 10% CH_3CN (pH 3,5); B: 70% CH_3CN, 30% H_2O. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 50% A, 50% B a 20% A, 80% B, durante 8 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 10 B14 1

UPLC (método 10_B14_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Se recogieron las detecciones UV a 214 nm y 254 nm utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 1,7 µM, 2,1 mm x 150 mm, 50ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían: A: 99,95% H_2O, 0,05% TFA; B: 99,95% CH_3CN, 0,05% TFA. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 70% A, 30% B, a 40% A, 60% B, durante 12 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 04 A6 1

UPLC (método 04_A6_1): El análisis RP se realizó utilizando un sistema Waters UPLC provisto de un detector de banda dual. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40ºC. El sistema UPLC estaba conectado a dos depósitos de eluyente que contenían: A: TRIS 10 mM, sulfato de amonio 15 mM, 80% H_2O, 20%, pH 7,3; B: 80% CH_3CN, 20% H_2O. Se utilizó el gradiente lineal siguiente: 95% A, 5% B a 10% A, 90% B, durante 16 minutos a un caudal de 0,40 ml/min.

Método 01 B4 1

UPLC (método 01_B4_1): El análisis RP se llevó a cabo utilizando un sistema Waters 600S provisto de un detector de red de diodos Waters 996. Se recogieron las detecciones UV utilizando una columna Waters 3 mm x 150 mm 3,5 um C-18 Symmetry. La columna se calentó a 42ºC y se eluyó con un gradiente lineal de 5-95% acetonitrilo, 90-0% agua, y 5% ácido trifluoroacético (1,0%) en agua durante 15 minutos a un caudal de 1 ml/min.

Método MALDI-MS

Los pesos moleculares se determinaron utilizando espectroscopía de masas láser asistida por matriz desorción y ionización con analizador de tiempo de vuelo registrada en un Microflex o Autoflex (Brucker). Se utilizó una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico.

Método NMR

Los espectros NMR del protón se registraron utilizando un equipo Brucker Avance DTX 300 (300 MHz) con tetrametilsilano como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm y los patrones de desdoblamiento se designan como sigue: s, singulete; d, doblete; dd, doblete doble; dt, triplete doble, t, triplete, tt, triplete de tripletes; q, cuartete; quint, quintete, sext, sextete, m, multiplete; y br = ancho.

B. Síntesis de compuestos intermedios

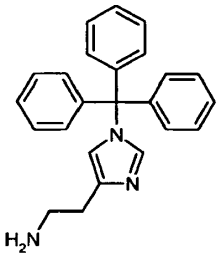
1. Síntesis de monoésteres de diácidos grasos

…

El reflujo durante una noche de los diácidos C12, C14, C16 y C18 con Boc-anhídrido, DMAP, y *t*-butanol en tolueno da predominantemente el monoéster *t*-butílico. Después del tratamiento se obtiene una mixtura de monoácido, diácido y diéster. La purificación se realiza por lavado, filtración con bloque corto de sílice y cristalización.

2. Síntesis de 2-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)-etil-amina

Chem. 13:



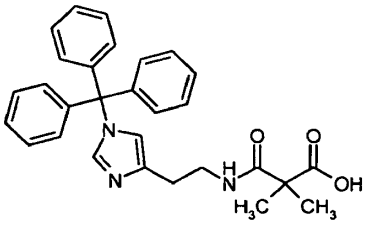
Se agitaron dihidrocloruro de histamina (20,47 g; 0,111 mol) y trietilamina (48 ml; 0,345 mol) en metanol absoluto (400 ml) a la temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió gota a gota éster etílico de ácido trifluoroacético (14,6 ml; 0,122 mol) en metanol (30 ml) durante 30 min a 0ºC. La mixtura de reacción se agitó durante 3,5 horas a la temperatura ambiente y se evaporó luego a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (450 ml) y se añadió trietilamina (31 ml; 0,222 mol). Se añadió luego cloruro de tritilo (34,1 g, 0,122 mol) poco a poco y la mixtura

se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Se vertieron cloroformo (400 ml) y agua (600 ml) en la mixtura de reacción. La capa acuosa se separó y se extrajo con cloroformo (3 x 400 ml). Las capas orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se eliminó el disolvente y el sólido beige se trituró con hexanos (1000 ml). La suspensión se filtró para dar 2,2,2-trifluoro-N-[2-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)-metil-acetamida como sólido blanco.
Rendimiento: 45,54 g (91%).
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 8,44 (bs, 1 H); 7,43 (s, 1 H); 7,41 -7,33 (m, 9 H); 7,19 - 7,10 (m, 6 H); 6,65 (s, 1 H); 3,66 (q, J=5,9 Hz, 2 H); 2,79 (t, J=5,9 Hz, 2 H).

La amida anterior (45,54 g; 0,101 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (1000 ml) y metanol (200 ml). Se añadió una solución de hidróxido de sodio (20,26 g; 0,507 mol) en agua (500 ml). La mixtura se agitó durante dos horas a la temperatura ambiente y se concentró luego a vacío. El residuo se separó entre cloroformo (1200 ml) y agua (800 ml). La capa acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 400 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. La incorporación del disolvente proporcionó un aceite pardo, que se secó durante 3 días a vacío para dar el producto del título como un sólido beige.
Rendimiento: 32,23 g (90%).
Rendimiento global: 82%.
P.f.: 111-113ºC.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,39 (d, J=1,3, 1 H); 7,38 - 7,32 (m, 9 H); 7,20-7,12 (m, 6 H); 6,61 (s, 1 H); 3,00 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 2,70 (t, J=6,5 Hz, 2 H); 1,93 (bs, 2 H).

3. Síntesis de ácido 2,2-dimetil-*N*-[2-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-etil-malonámico

Chem. 14:

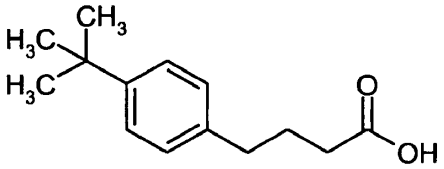


Una mixtura de ácido de Meldrum (5,52 g, 38,3 mmol), carbonato de potasio (26,5 g, 191 mmol) y yoduro de metilo (7,15 ml, 115 mmol) en acetonitrilo (105 ml) se calentó a 75ºC en un tubo herméticamente cerrado durante 7 horas. La mixtura se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (300 ml), se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad a vacío. Se añadieron acetato de etilo (75 ml), hexanos (75 ml) y agua (50 ml), y se separaron las fases. La capa orgánica se lavó con solución acuosa al 10% de tiosulfato de sodio (50 ml) y agua (50 ml). Se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se eliminó el disolvente a vacío para dar 2,2,5,5-tetrametil-[1,3]dioxano-4,6-diona como sólido blanco.
Rendimiento: 6,59 g (79%).
R_F (SiO_2, cloroformo/acetato de etilo, 98:2): 0,60.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 1,76 (s, 6H); 1,65 (s, 6H).

Una solución de 2-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)-etil-amina (5,00 g, 14,2 mmol) preparada como se ha escrito arriba y trietilamina (9,86 ml, 70,7 mmol) en tolueno (80 ml) se añadió gota a gota durante 50 min a una solución del compuesto diona anterior (3,65 g, 21,2 mmol) en tolueno (40 ml) a 75ºC. La mixtura se agitó a esta temperatura durante 3 horas más (hasta que la amina de partida se detectó por TLC), después de lo cual se evaporó a sequedad. El residuo se redisolvió en cloroformo (300 ml) y se lavó con solución acuosa al 10% de ácido cítrico (200 ml). La fase acuosa se extrajo con cloroformo (2 x 60 ml); las fases clorofórmicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se trituró con cloroformo caliente (140 ml); se añadieron hexanos (70 ml) y la suspensión se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. Los sólidos se separaron por filtración, se lavaron con una mixtura cloroformo/hexanos (1:1, dos x 50 ml) y se secaron a vacío para dar el producto del título.
Rendimiento: 6,73 g (88%).
P.f.: 161-16ºC.
R_F (SiO_2, cloroformo/metanol, 85:15): 0,40.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, δ_H): 12,45 (bs, 1 H); 7,66 (t, J=5,1 Hz, 1 H); 7,57-7,31 (m, 9 H); 7,26 (s, 1 H); 7,20-7,02 (m, 6 H); 6,66 (s, 1 H); 3,25 (m, 2 H); 2,57 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 1,21 (s, 6 H).

4. Síntesis de ácido 4-(4-*terc*-butil-fenil)-butírico

Chem. 15:

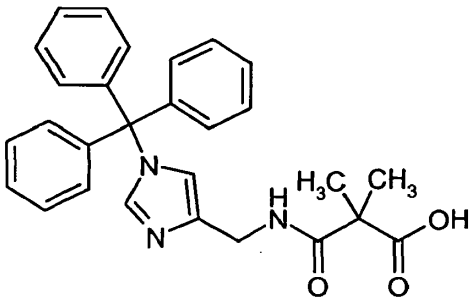


Se añadió polvo de cloruro de aluminio (80,0 g, 600 mmol) en porciones a una mixtura agitada de *terc*-butilbenceno (40,0 g, 300 mmol) y anhídrido succínico (26,7 g, 267 mmol) y 1,1,2,2-tetracloroetano (100 ml). Después que se hubo añadido la totalidad del cloruro de aluminio, la mixtura se vertió en una mixtura de hielo (500 ml) y ácido clorhídrico concentrado (100 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con agua (500 ml) y se separó el disolvente por destilación. El residuo sólido se disolvió en solución acuosa caliente al 15% de carbonato de sodio (1000 ml), se filtró, se enfrió y se precipitó el ácido con ácido clorhídrico (acidificado a pH = 1). El ácido bruto se filtró, se secó al aire y se recristalizó en benceno (500 ml) para dar ácido 4-(4-*terc*-butil-fenil)-4-oxo-butírico como cristales incoloros.
Rendimiento: 36,00 g (58%).
P.f.: 117-120ºC.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,93 (dm, J=8,3 Hz, 2 H); 7,48 (dm, J=8,3 Hz, 2 H); 3,30 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 2,81 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 1,34 (s, 9 H).

Una mixtura del ácido anterior (36,0 g, 154 mmol), hidróxido de potasio (25,8 g, 462 mmol), hidrato de hidracina (20 ml, 400 mmol) y etilenglicol (135 ml) se calentó a reflujo durante 3 horas, y se destiló luego hasta que la temperatura del vapor se había elevado a 196-198ºC. Después de 14 horas de reflujo adicionales, la mixtura se dejó enfriar ligeramente, y se vertió luego en agua fría (200 ml). La mixtura se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (a pH = 1) y se extrajo con diclorometano (2 x 400 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (Gel de sílice 60A; 0,060-0,200 mm; eluyente: hexanos/acetato de etilo 10:1-6:1) para dar el producto del título como un sólido blanquecino.
Rendimiento: 16,25 g (48%).
P.f.: 59-60ºC.
R_F (SiO_2, acetato de etilo): 0,60.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,31 (dm, J=8,1 Hz, 2 H); 7,12 (dm, J=8,1 Hz, 2 H); 2,64 (t, J=7,6 Hz, 2 H); 2,38 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 1,96 (m, 2 H); 1,31 (s, 9 H).

5. Síntesis de ácido 2,2-dimetil-*N*-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-ilmetil)-malonámico

Chem. 16:



Se añadió hidrocloruro de hidroxilamina (15,9 g, 229 mmol) a una solución de 4(5)-imidazol-carboxaldehído (20,0 g, 209 mmol) y carbonato de sodio (12,1 g, 114 mmol) en agua (400 ml) y la solución resultante se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. La mixtura se evaporó a 100 ml y se enfrió en un baño de hielo. Los sólidos se separaron por filtración y el filtrado se concentró a 40 ml. Después de enfriar a 0ºC, se obtuvo otra porción de cristales. Los sólidos (23 g) se combinaron y se recristalizaron en etanol (aprox. 160 ml) para proporcionar imidazol-4(5)-carbaldehído-oxima como cristales incoloros.
Rendimiento: 15,98 g (69%).
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, acetona-d_3+D_2O, δ_H): 7,78 (bs, 1 H); 7,74 (d, J=0,9 Hz, 1 H); 7,43 (s, 1 H).
Se añadió gota a gota cloruro de acetilo (51,0 ml, 718 mmol) a metanol (670 ml) a 0ºC bajo argón. Después de 30 min, se retiró el baño de enfriamiento y se añadió la oxima anterior (16,0 g, 144 mmol), seguido por paladio sobre carbono (5% en peso, 6,1 g). La mixtura se hidrogenó a la presión atmosférica durante 17 horas, después de lo cual se filtró a través de Celita y se evaporó el disolvente para proporcionar dihidrocloruro de 4-(aminometil) imidazol puro como cristales incoloros.
Rendimiento: 23,92 g (98%).

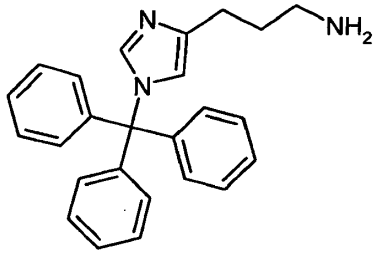
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, D_2O, δ_H): 8,72 (s, 1H); 7,60 (s, 1H); 4,33 (s, 2H).

El dihidrocloruro de amina anterior (18,9 g; 111 mmol) y trietilamina (93 ml; 667 mmol) en metanol (1000 ml) se agitaron a la temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió gota a gota éster etílico de ácido trifluoroacético (13,3 ml; 111 mmol) en metanol (30 ml) durante 40 min a 0ºC. La mixtura de reacción se agitó durante 18 horas a la temperatura ambiente y se evaporó luego a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en diclorometano seco (2000 ml) y se añadió trietilamina (31 ml; 222 mmol). Se añadió luego cloruro de tritilo (31,6 g; 113 mmol) y la mixtura se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Se vertieron cloroformo (1000 ml) y agua (1000 ml) en la mixtura de reacción. Se separó la capa acuosa y se extrajo con cloroformo (2 x 300 ml). Las capas orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se eliminó el disolvente y el sólido beige se trituró con hexanos (1000 ml). La suspensión se filtró para dar 2,2,2-trifluoro-*N*-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-ilmetil)-acetamida como sólido blanco.
Rendimiento: 46,59 g (96%).
R_F (SiO_2, diclorometano/metanol 95:5): 0,35.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, δ_H): 9,77 (t, J=5,7 Hz, 1 H); 7,47-7,34 (m, 9 H); 7,33 (d, J=1,5 Hz, 1 H); 7,13-7,03 (m, 6 H); 6,80 (d, J=0,8 Hz, 1 H); 4,25 (d, J=5,7 Hz, 2 H).

La amida anterior (46,6 g; 107mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (600 ml) y etanol (310 ml). Se añadió una solución de hidróxido de sodio (21,4 g; 535 mmol) en agua (85 ml). La mixtura se agitó durante 5 horas a la temperatura ambiente y se concentró luego a vacío. El residuo se separó entre cloroformo (1600 ml) y agua (800 ml). La capa acuosa se extrajo con cloroformo (4 x 200 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó (1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-metilamina como sólido blanquecino.
Rendimiento: 36,30 g (100%).
Se añadió gota a gota una solución de la amina anterior (10,0 g, 29,5 mmol) y trietilamina (20,5 ml, 147 mmol) en tolueno (220 ml) durante 45 min a una solución de 2,2,5,5-tetrametil-[1,3]dioxano-4,6-diona (3,65 g, 21,2 mmol) en tolueno (80 ml) a 75ºC. La mixtura se agitó a esta temperatura durante 3 horas más (hasta que la amina de partida se detectó en la TLC), después de lo cual se evaporó la misma a sequedad. El residuo se redisolvió en cloroformo (500 ml) y se lavó con solución acuosa al 10% de ácido cítrico (300 ml). La fase acuosa se extrajo con cloroformo (100 ml); las fases clorofórmicas se combinaron, se lavaron con agua (150 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna flash (gel de sílice Fluka 60, diclorometano/metanol 98:2 a 9:1) y se cristalizó en una mixtura cloroformo/hexanos para dar el producto del título como cristales beige.
Rendimiento: 9,80 g (73%).
P.f.: 174-175ºC.
R_F (SiO_2, cloroformo/metanol, 85:15): 0,35.
Espectro ^{1H} NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 8,45 (t, J=5,8 Hz, 1 H); 7,53 (s, 1 H); 7,40-7,28 (m, 9 H); 7,14-7,01 (m, 6 H); 6,84 (s, 1 H); 4,39 (d, J=5,8 Hz, 2 H); 1,44 (s, 6 H).

6. Síntesis de 3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-propil-amina

Chem. 17:



Se añadió 3-(1-tritil-4-imidazolil)propionato de etilo (93,0 g, 223 mmol) en tetrahidrofurano/éter dietílico (1:1, 100 ml) gota a gota a una suspensión de hidruro de litio y aluminio (17,0 g, 446 mmol) durante 1 hora. La mixtura se calentó a reflujo durante 3 horas, se trató luego con agua (100 ml), hidróxido de sodio al 20% (100 ml) y agua (100 ml) bajo enfriamiento con hielo/agua, se filtró y el sólido se lavó con tetrahidrofurano. La fase orgánica se secó sobre carbonato de potasio anhidro, se filtró y se evaporó para dar 3-(1-tritil-4-imidazolil)propanol como sólido blanco.
Rendimiento: 68,0 g (82%).
P.f.: 127-129ºC.
Espectro ^{1H} NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,40-7,24 (m, 10 H); 7,17-7,06 (m, 6 H); 6,55 (s, 1 H); 3,72 (t, J=5,3 Hz, 2 H); 2,68 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 1,86 (m, 2 H).

Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (8 ml, 104 mmol), gota a gota a una solución del alcohol anterior (32,0 g, 86,8 mmol) en diclorometano (400 ml) y trietilamina (15,5 ml) a 0ºC durante 1 hora. La mixtura se agitó sin enfriamiento durante 1 hora más; después de ello se lavó la misma con bicarbonato de sodio al 5% y se secó sobre

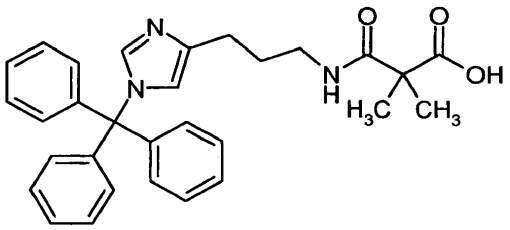
sulfato de magnesio anhidro. Se evaporó el diclorometano a 30ºC a vacío y el mesilato aceitoso residual se utilizó directamente en el paso siguiente.
Rendimiento: 31,2 g (80%).
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,37-7,30 (m, 10 H); 7,16-7,09 (m, 6 H); 6,58 (s, 1 H); 4,24 (t, J=6,3 Hz, 2 H); 2,96 (s, 3 H); 2,67 (m, 2 H); 2,10 (m, 2 H).

Una mixtura del mesilato anterior (30,0 g, 67 mmol), ftalimida potásica (18,0 g, 100 mmol), yoduro de sodio (4,0 g, 26,7 mmol) y dimetilformamida (200 ml) se agitó durante una noche a la temperatura ambiente y se trató luego con agua (2 L) y benceno (2 L). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente dando un residuo, que se recristalizó en benceno proporcionando 1-tritil-4-(3-ftalimidopropil)imidazol como sólido blanco.
Rendimiento: 17,2 g (52%).
P.f.: 211-214ºC.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,83 (m, 2 H); 7,72 (m, 2 H); 7,39-7,27 (m, 10 H); 7,18-7,07 (m, 6 H); 6,60 (d, J=0,9 Hz, 1 H); 3,72 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 2,60 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,99 (m, 2 H).

El derivado de imidazol anterior (26,6 g, 53,5 mmol) se disolvió en etanol (300 ml) y tetrahidrofurano (150 ml) a 60ºC, se añadió hidrato de hidracina (50 g, 1 mol) y la solución se calentó a reflujo durante 6 horas y se calentó luego a 60ºC durante una noche. El sólido se separó por filtración y el filtrado se trató con solución acuosa de amoníaco al 25% (2,5 L) y diclorometano (2,5 L). La capa orgánica se secó sobre carbonato de potasio anhidro y se evaporó para dar un residuo, que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (Fluka 60, cloroformo saturado con amoníaco/metanol) dando el compuesto del título como sólido blanco.
Rendimiento: 14,2 g (72%).
P.f.: 112-113ºC.
R_F (SiO_2, cloroformo saturado con amoníaco/metanol, 9:1): 0,30.
Espectro ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ_H): 7,37-7,28 (m, 10 H); 7,18-7,09 (m, 6 H); 6,53 (d, J=1,3 Hz, 1 H); 2,74 (t, J=6,9 Hz, 2 H); 2,59 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 1,95 (bs, 2 H); 1,78 (m, 2 H).

7. Síntesis de ácido 2,2-dimetil-N-[3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)propil]-malonámico

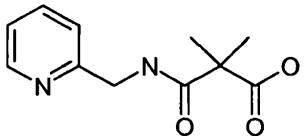
Chem. 18:



Se esponjó resina de cloruro de 2-clorotritilo (2,3 g, 3,0 mmol) en DCM durante 20 min y se filtró. Se disolvió ácido dimetilmalónico (2 eq; 6,0 mmol; 793 mg) en DCM:DMF 1:1 (10 ml) y se añadió a la resina seguido por DIPEA (6 eq; 18,0 mmol; 3,14 ml) y DCM (10 ml). La resina se agitó con sacudidas durante una noche a RT. Se filtró la resina y se lavó con DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1, DCM, NMP, og DCM (2 x 25 ml de cada uno). La resina se esponjó en DMF durante 20 min y se filtró. Se añadió HOAt (3 eq; 9,0 mmol; 1,23 g), DIC (3 eq; 9,0 mmol; 1,40 ml) y DMF (25 ml) y la resina se agitó con sacudidas durante 90 min a RT. La resina se filtró y se añadió 3-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)propil-amina (1,8 eq; 5,40 mmol; 1,84 g), DIPEA (4 eq; 6,0 mmol; 2,0 ml), y DMF (10 ml). La resina se agitó con sacudidas durante dos días. Se filtró la resina y se lavó con NMP (5 x 20 ml) y DCM (10 x 20 ml). Se añadió 2,2,2-trifluoroetanol/diclorometano 1:1 (20 ml) a la resina y se agitó la misma con sacudidas durante dos horas. La resina se lavó con 2,2,2-trifluoroetanol/diclorometano 1:1 (10 ml) y los filtrados reunidos se recogieron y se concentraron a vacío para dar el compuesto del título.
Rendimiento: 600 mg (41%)
LCMS4: *m/z* = 482 (M+1)
UPLC (método 02_B4_4): Rt = 8,07 min
Espectro 1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, δ_H): 7,36-7,44 (9H, m), 7,07-7,12 (6H, m), 6,62 (1H, s), 3,02-3,09 (2H, q), 2,38-2,43 (2H, t), 1,61-1,69 (2H, m), 1,26 (6H, s).

8. Síntesis de ácido 2,2-dimetil-*N*-[3-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)propil]-malonámico. Síntesis de 2,2-dimetil-*N*-piridin-2-ilmetilmalonámico

Chem. 19:



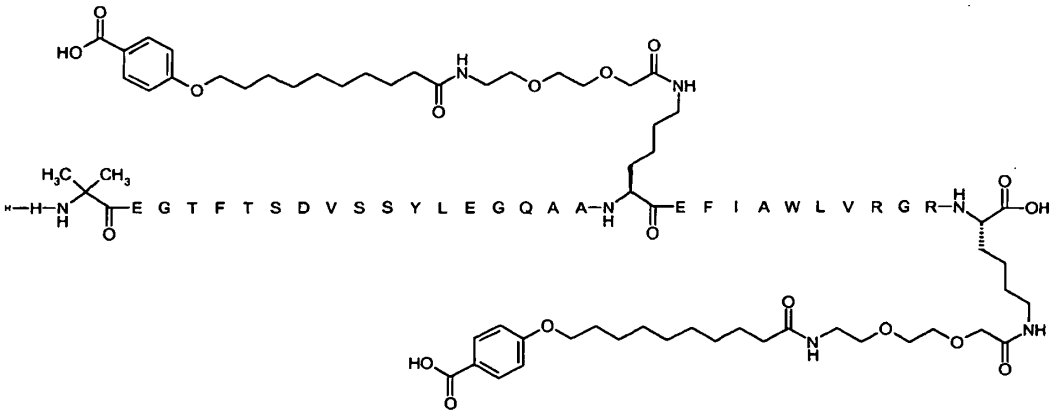
Se esponjó resina de cloruro de clorotritilo (2,3 g, 3,0 mmol) en DCM durante 20 min y se filtró. Se disolvió ácido dimetilmalónico (2 eq: 6,0 mmol; 793 mg) en DCM:NMP 1:1 (10 ml) y se añadió a la resina seguido por DIPEA (6 eq; 18,0 mmol; 3,14 ml) y DCM (10 ml). La resina se agitó con sacudidas durante una noche a RT. Se filtró la resina y se lavó con DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1), DCM, NMP og DCM (2 x 25 ml de cada uno). La resina se esponjó en NMP durante 20 min y se filtró. Se añadió HOAt (3 eq; 9,0 mmol; 1,23 g), DIC (3 eq; 9,0 mmol; 1,40 ml) y NMP (25 ml) y la resina se agitó con sacudidas durante 90 min a RT. La resina se filtró y se añadió 2-(aminometil)piridina (2 eq; 6 mmol; 659 mg), DIPEA (4 eq; 6,0 mmol; 2,09 ml) y NMP (10 ml). La resina se agitó con sacudidas durante una noche. Se filtró la resina y se lavó con NMP (5 x 20 ml) y DCM (10 x 20 ml). Se añadió TFA/TIS/agua (95:2,5:2,5; 30 ml) a la resina y se agitó con sacudidas durante 1 hora, se filtró y se concentró a vacío para dar el compuesto del título.
Rendimiento: 600 mg (41%).
LCMS4: *m/z* = 223 (M+1)
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 1,79 min

B. Síntesis de compuestos de la invención

Ejemplo 1

$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi}etoxi)acetil], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi}-etoxi)acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37)

Chem. 20:

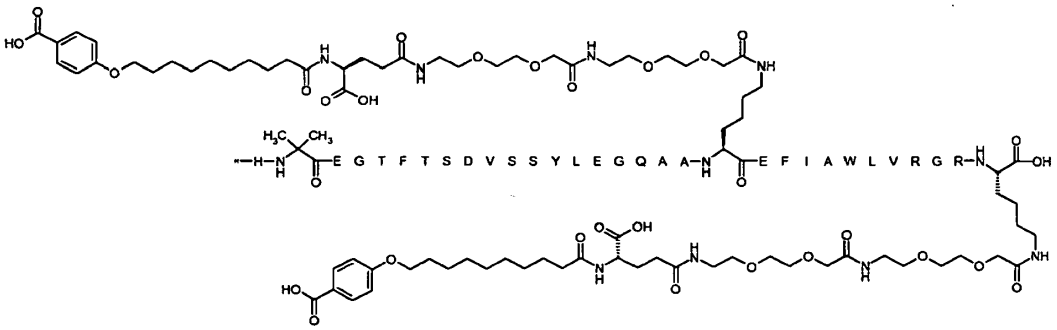


Método de preparación: SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys (Mtt)-resina Wang de carga baja). Se utilizó Fmoc-Lys (Mtt)-OH en posición 26, y se utilizó Boc-His-trt)-OH en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech) y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso dos de WO 2006/082204) utilizando un método de acoplamiento doble en el Sintetizador de Péptidos Liberty.
UPLC (método 04_A3_1): 10,51 min.
LCMS4: *m/z* = 1085,2 $(M+4H)^{4+}$. 1447,3 $(M^{+}3H)^{3+}$.

Ejemplo 2

$N^{\varepsilon 26}${2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butyrilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)

Chem. 21:

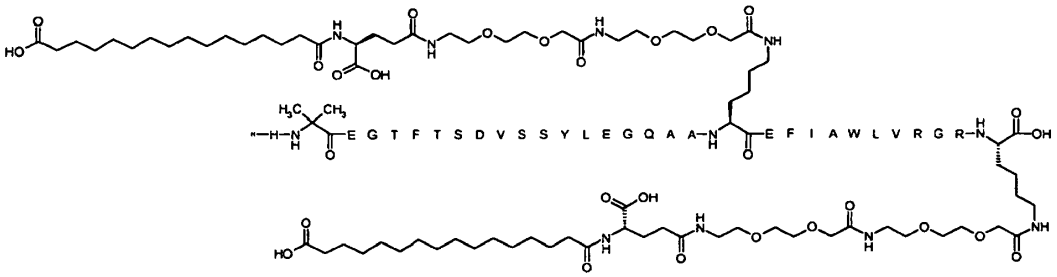


Método de preparación. SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys (Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys (Mtt)-OH en posición 26, y se utilizó Boc-His (Trt)-Oh en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu, y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso dos de WO 2006/082204) utilizando un método de acoplamiento doble en el Sintetizador de Péptidos Liberty.
UPLC (método 04_A3_1): 7,19 min.
LCMS4: m/z = 978,5 $(M+5H)^{5+}$, 1222,8 $(M+4H)^{4+}$, 1630,1 $(M+3H)^{3+}$.

Ejemplo 3

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil-amino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 22:



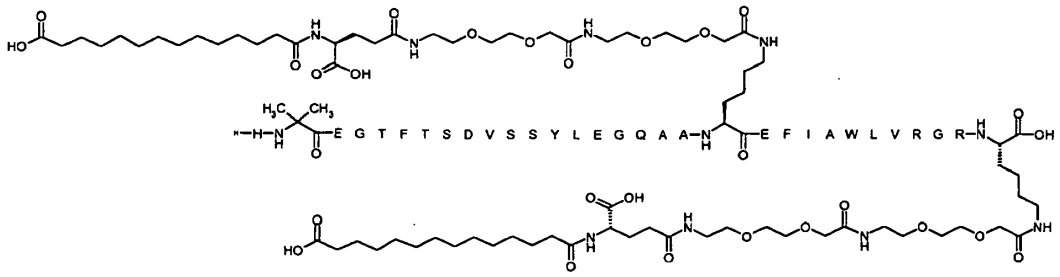
Método de preparación: El péptido se sintetizó en Lys (Mtt)-resina Wang con una carga de 0,35 mmol/g. La síntesis se realizó en un Sintetizador Liberty en condiciones de microondas utilizando acoplamientos simples durante 5 minutos con DIC/HOBt a hasta 60ºC, excepto para histidina que se acopló durante 20 minutos a hasta 50ºC. Todos los aminoácidos se protegieron con grupos protectores estándar, excepto para las lisinas a acilar (en este caso Lys26), que se protegió con Mtt. La desprotección se realizó con piperidina al 5% en NMP a 50ºC durante 3 minutos. Después que se completó la síntesis, se bloqueó el término N con 10 equivalentes de Boc-carbonato y 10 equivalentes de DIPEA durante 30 minutos. Los grupos Mtt se eliminaron por tratamiento con hexafluoroisopropanol puro (sin diluir) durante 20 minutos y las cadenas laterales se construyeron gradualmente en el Liberty utilizando el mismo protocolo que en el caso anterior con empleo de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, Fmoc-Glu-OBut, y mono-*t*-butil-éster de ácido hexadecanodioico. El péptido se escindió con TFA/agua/TIS (95:2,5:2,5) durante dos horas y se aisló por precipitación con éter dietílico. El péptido bruto se purificó por HPLC preparativa en una columna de 20 mm x 250 mm rellena con sílice C18 5u o 7u. El péptido se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50% y se diluyó a 20 ml con agua, después de lo cual se inyectó en la columna que se eluyó luego con un gradiente de 40-60% CH_3CN en TFA al 0,1%, 10 ml/min durante 50 min a 40ºC. Las fracciones que contenían el péptido se recogieron y se evaluó su pureza por MALDI y UPLC. El péptido purificado se liofilizó después de dilución del eluato con agua.

La masa molecular teórica de 4844,6 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 9,50 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 11,23 min.

Ejemplo 4

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxy-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetil], *NN*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37)**

Chem. 23:

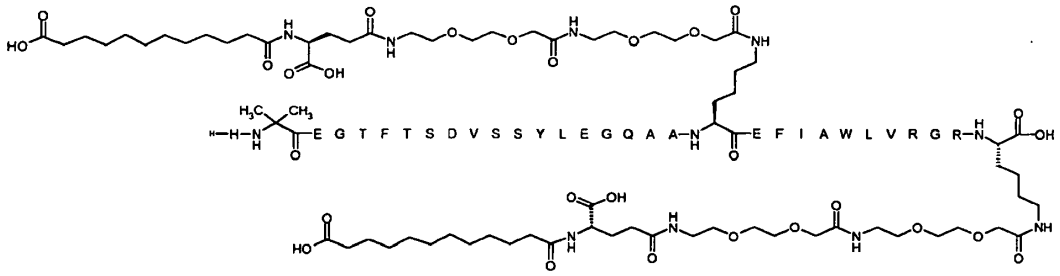


Método de preparación: Como en el Ejemplo 3, excepto por el uso de mono-*t*-butil-éster de ácido tetradecanodioico en la cadena lateral.
La masa molecular teórica de 4788,5 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 8,74 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 9,39 min.

Ejemplo 5

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetil], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 24:



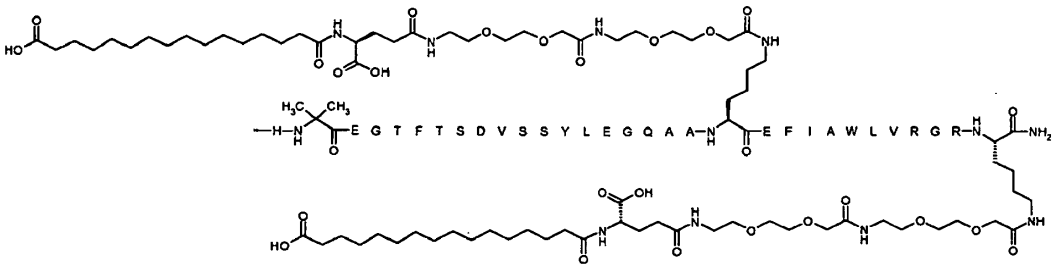
Método de reparación: Como en el Ejemplo 3, excepto por el uso de mono-*t*-butil-éster de ácido dodecanodioico en la cadena lateral.

La masa molecular teórica de 4732,4 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 8,19 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 8,17 min.

Ejemplo 6

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}-etoxi)acetilo], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(15-0carboxipentadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil-amino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

Chem. 25:



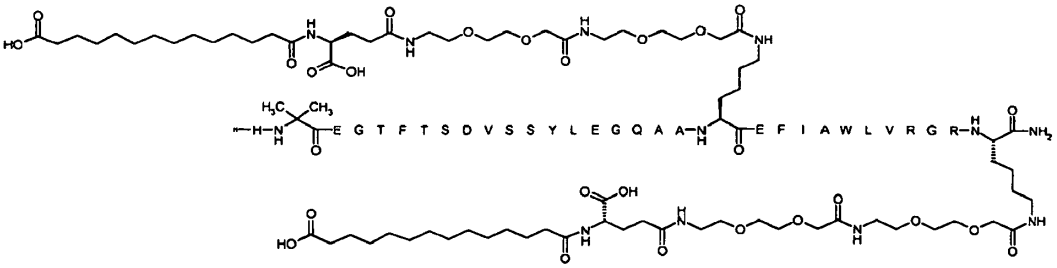
Método de preparación: Como en el Ejemplo 3, excepto que la resina utilizada fue Tentagel S RAM con una carga de 0,24 mmol/g y se utilizó el Fmoc-Lys(Mtt) en ambas posiciones 26 y 37.

La masa molecular teórica de 4843,6 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 9,43 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 11,88 min.

Ejemplo 7

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetilo], N*N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

Chem. 26:



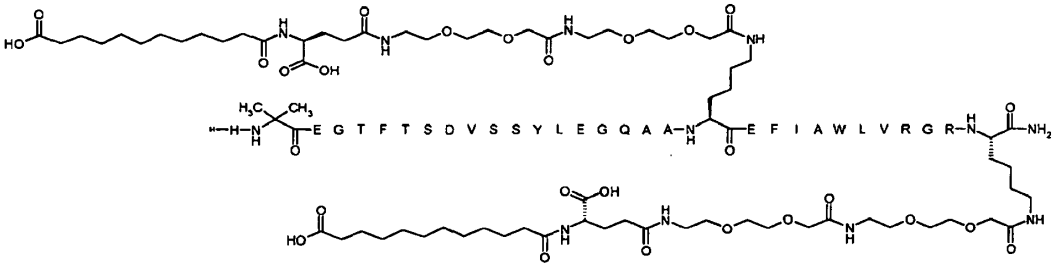
Método de preparación: Como en el Ejemplo 6, excepto por el uso de mono-*t*-butil-éster de ácido tetradecanodioico en la cadena lateral.

La masa molecular teórica de 4787,5 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 8,72 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 9,98 min.

Ejemplo 8

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetilo], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

Chem. 27:



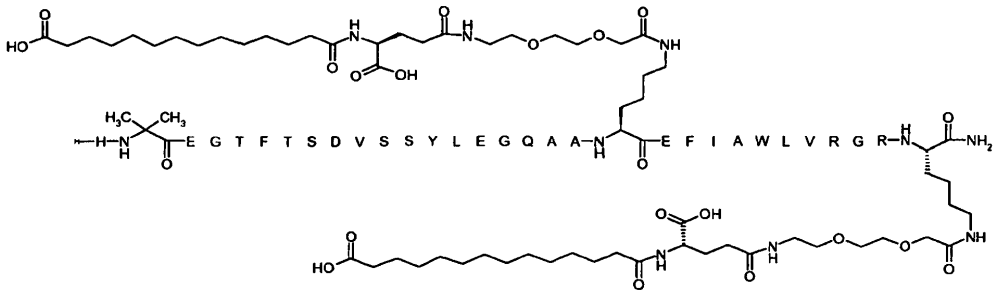
Método de preparación: Como en el Ejemplo 6, excepto por el uso de mono-*t*-butil-éster de ácido tetradecanodioico en la cadena lateral.

La masa molecular teórica de 4731,4 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 8,16 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 8,83 min.

Ejemplo 9

***NN*$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilo], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

Chem. 28:



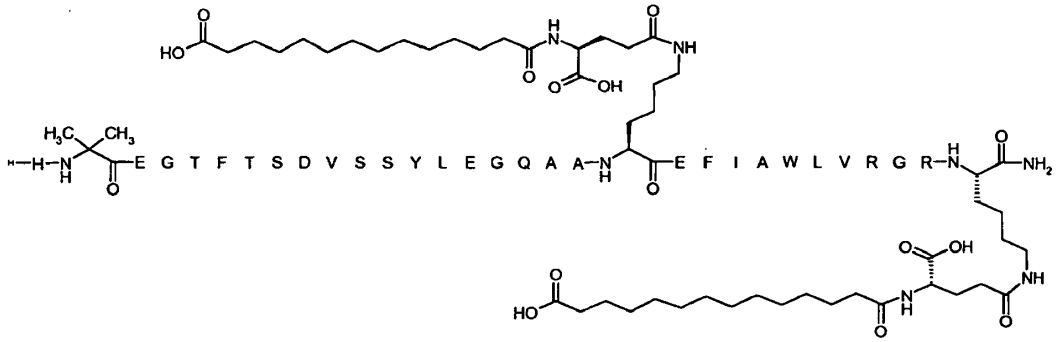
Método de preparación: como en el Ejemplo 7.

La masa molecular teórica de 4497,2 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 8,85 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 10,27 min.

Ejemplo 10

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butirilamino]][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

Chem. 29:

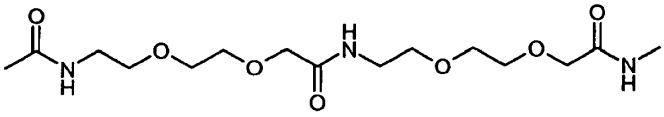


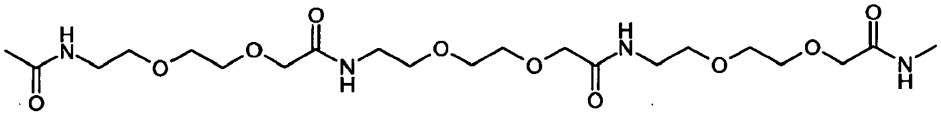
Método de preparación: como en el Ejemplo 7.

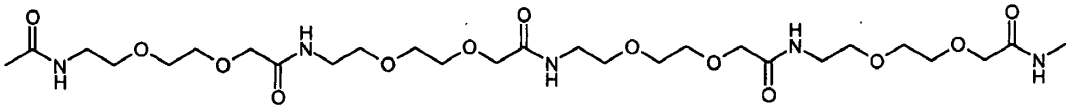
La masa molecular teórica de 4206,8 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 9,04 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 10,68 min.

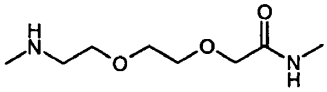
Ejemplo 11

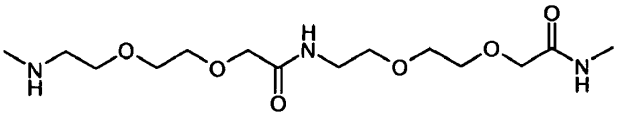
***N*$^{\varepsilon 26}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}acetilamino)etoxi]etoxi}acetil), *N*$^{\varepsilon 37}$-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)etoxi]etoxi}acetilamino)etoxi]etoxi}acetil)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37) amida**

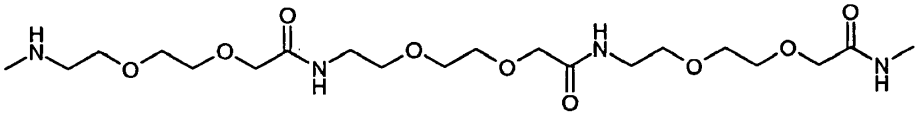

,


,

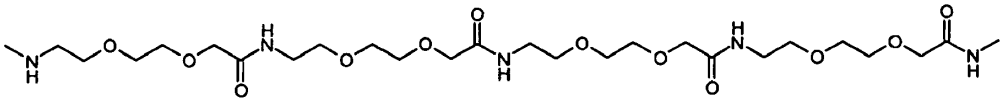



,


,


,

y

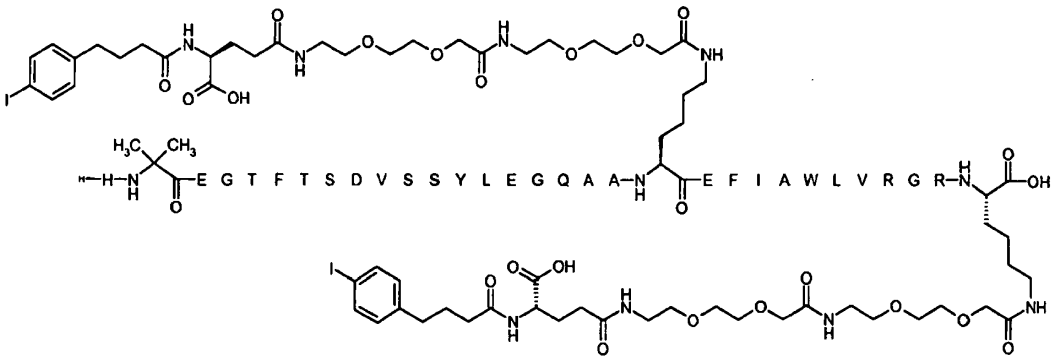

.

Método de preparación: como en el Ejemplo 7.

La masa molecular teórica de 4529,2 se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 9,07 min.
UPLC (método 04_A3_1): Rt 13,31 min.

Ejemplo 12
***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[4-(4-yodo-fenil)-butirilamino]-butirilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil-amino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 31:

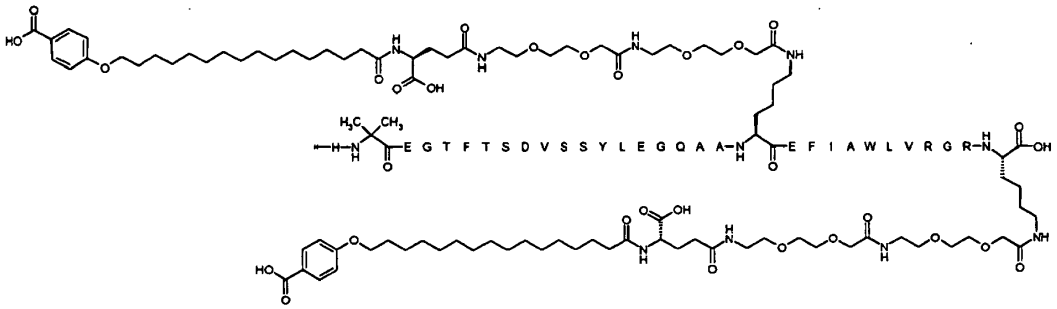


Método de preparación: SPPS método B, ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), ácido 4-(4-yodofenil)butírico (disponible comercialmente de Aldrich) y Fmoc-Glu-OtBu se acoplaron utilizando SPPS método D.
UPLC (método 04_A4_1): Rt 8,54 min.
UPLC (método 01_A4_2): Rt 10,23 min.
LCMS4: Rt = 2,4 min, m/z = 971 (m/5) 1213 (m/44) 1617 (m/3).

Ejemplo 13

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[16-(4-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-[16-(4-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 32:

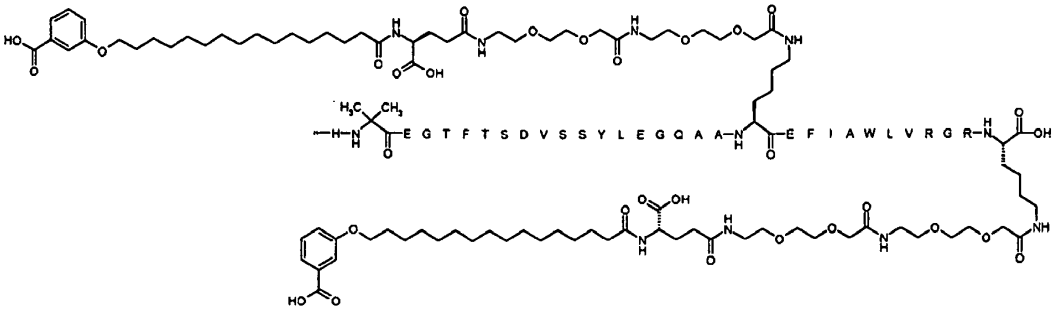


Método de preparación: SPPS método B. El producto final se caracterizó por UPLC y LC-MS analíticas con la excepción de que se realizó un paso de protección terminal con anhídrido acético después del acoplamiento de los aminoácidos siguientes: Trp31, Ala25, Tyr19, Phe12 y Aib8 (2 ½ min, 85ºC con anhídrido de ácido acético 1 N en NMP). El éster *terc*-butilico de ácido 4-(15-carboxipentadeciloxi)benzoico se puede preparar como se describe en el Ejemplo 17 de WO 07128817.
UPLC (método 08_B4_1): Rt 11,272 min.
UPLC (método 05_B10_1): Rt 7,319 min.
LCMS4: Rt = 2,37 min, m/z = 5054,48. MW calculado = 5056,82.

Ejemplo 14

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[16-(3-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[16-(3-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 33:



Preparación de éster *terc*-butílico de ácido 3-hidroxi-benzoico

Una mixtura de ácido 3-hidroxibenzoico (55,0 g, 400 mmoles), decarbonato de di-*terc*-butilo (178 g, 820 mmoles), perclorato de magnesio (0,89 g, 4,0 mmoles) y nitrometano seco (750 ml) se agitó a 40ºC durante 96 horas. Se añadió acetato de etilo (800 ml) y la capa orgánica se lavó con solución acuosa al 5% de bicarbonato de sodio (1500 ml). La solución orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó luego a vacío. El residuo se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice Fluka 60, hexanos/acetato de etilo 8:1) proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco.
Rendimiento: 9,07 g (12%)
P.f.: 94-96ºC
Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl3, δ_H (dH)): 7,61-7,53 (m, 2 H); 7,29 (t, J=8,1 Hz, 1 H); 7,05 (m, 1 H); 6,06 (bs, 1 H); 1,59 (s, 9 H).

Preparación de éster metílico de ácido 16-bromo-hexadecanoico

Se disolvió ácido 16-bromo-hexadecanoico (6,0 g) en MeOH (35 ml), tolueno (100 ml) y ortoformiato de trimetilo (20 ml), y se añadió luego Amberlyst 15 de Fluka (1,4 g). La mixtura se agitó a 55ºC durante 16 horas. Se evaporó la mixtura a sequedad y se secó a vacío durante 16 horas para dar 7,7 g. El residuo se resuspendió en MeOH (aprox. 50 ml) y se agitó durante aprox ½ h. El Amberlyst 15 se separó por filtración después de agitar con DCM (30 ml) durante ½ h. El filtrado se concentró para separar el DCM, y la solución clara se enfrió, después de lo cual se añadió más MeOH (aprox 20 ml, total aproximado 40 ml). Se enfrió el matraz y precipitaron más cristales, y después de agitar durante 30 min, los cristales se separaron por filtración y se lavaron con MeOH frío. Los cristales blancos se secaron a vacío para dar 5,61 g.

Preparación de éster *terc*-butílico de ácido 3-(15-metoxicarbonil-pentadeciloxi)-benzoico

Se disolvió éster *terc*-butílico de ácido 3-hidroxi-benzoico (1,79 g) en 75 ml de MeCN, y se añadió luego éster metílico de ácido bromo-hexadecanoico (3,22 g) seguido por K_2CO_3 (2,5 g). La reacción se agitó durante 3 d a 80ºC. La mixtura de reacción se filtró. Se evaporó el filtrado, y el residuo se disolvió en EtOAc 100 ml, y la capa de EtOAc se lavó dos veces con 100 ml de salmuera. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se separó por evaporación para dar 4,165 g (98%).

Preparación de éster *terc*-butílico de ácido 3-(15-carboxi-pentadeciloxi)-benzoico

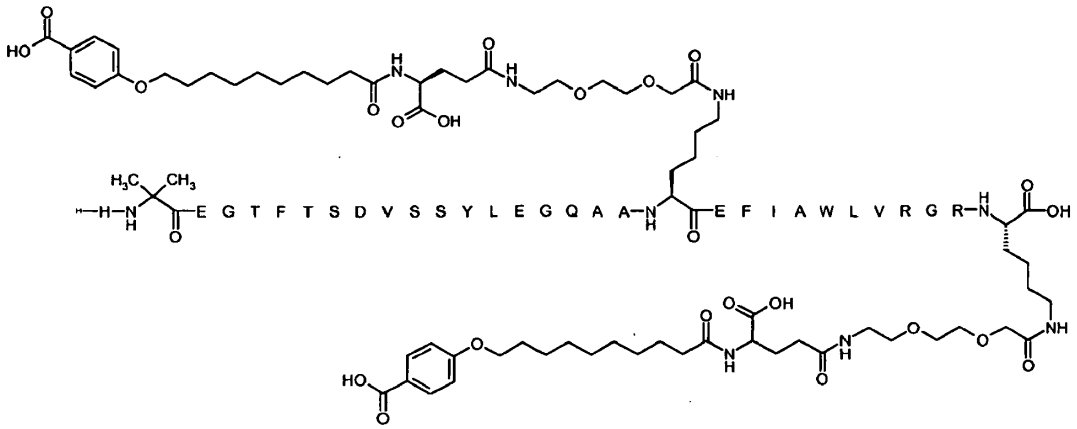
Se disolvió éster *terc*-butílico de ácido 3-(15-metoxicarbonil-pentadeciloxi)-benzoico (4,165 g) en 50 ml de THF y 50 ml de MeOH. Se añadió agua (10 ml) seguido por LiOH (0,565 g, 3,5 mmoles). La reacción se mantuvo durante 16 horas a la temperatura ambiente. La mixtura de reacción se evaporó y el residuo se disolvió en 150 ml EtOAc, y se añadieron 80 de agua y 20 ml de HCl 1 N. las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se eliminó por evaporación para dar un compuesto sólido blanco (3,91 g, 97%).

Método de preparación: SPPS método B y utilización de éster *terc*-butílico de ácido 3-(15-carboxi-pentadeciloxi)-benzoico de manera similar al Ejemplo 1. El producto final se caracterizó por UPLC y LCMS analíticas con la excepción de que se realizó un paso de protección terminal con anhídrido acético después del acoplamiento de los aminoácidos siguientes: Trp31, Ala25, Tyr19, Phe12 y Aib8 (2 ½ min, 65ºC con anhídrido de ácido acético 1N en NMP).
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 11.201 min
UPLC (método 05_B10_1): Rt = 8.622 min
LCMS4: Rt = 2.37 min, m/z = 1011.88(m/5); 1664.32(m/4); 5053.28
MW calculado = 5056,82.

Ejemplo 15

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)-etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]-butirilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 34:



Método de preparación: SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja.

Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, y se utilizó Boc-His(Trt)-OH en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris

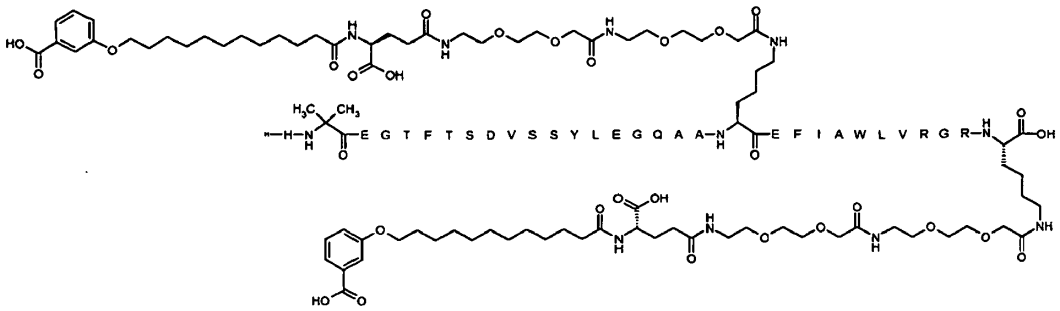
Biotech), Fmoc-Glu-OtBu y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082204) utilizando SPPS método D.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 8,8 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 9,6 min
LCMS4: 4598,0

MW calculado = 4598,2.

Ejemplo 16

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[12-(3-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 35:

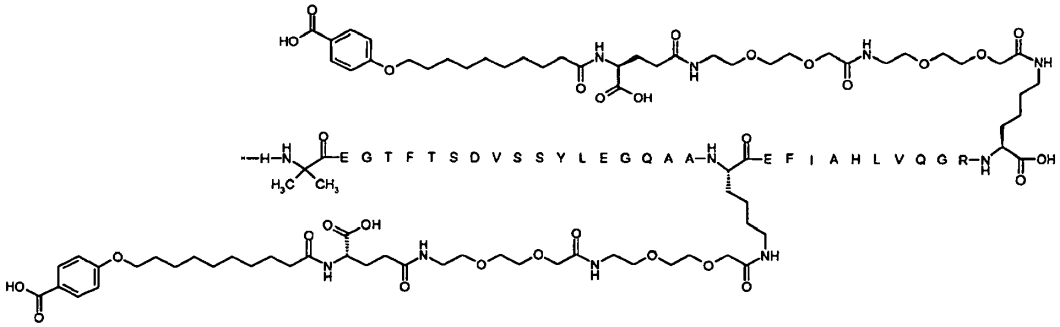


Método de preparación: SPPS método B. El éster *terc*-butílico de ácido 3-(11-carboxi-undeciloxi)-benzoico se preparó de manera similar a la descrita para éster *terc*-butílico de ácido 3-(15-carboxi-pentadeciloxi)-benzoico, empleando ácido 2-bromododecanoico. El producto final se caracterizó por UPLC y LC-MS analíticas con la excepción de que se realizó un paso de protección terminal con anhídrido acético después del acoplamiento de los aminoácidos siguientes: Trp31, Ala25, Tyr19, Phe12 y Aib8 (2 ½ min, 65ºC con anhídrido de ácido acético 1N en NMP).
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 9,449 min
LCMS4: Rt = 2,37 min, m/z = m/z: 1011,88(m/4); 1264,32(m/3); 4942,24
MW calculado = 4944,608.

Ejemplo 17

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetil]-*N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]-[Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 36:

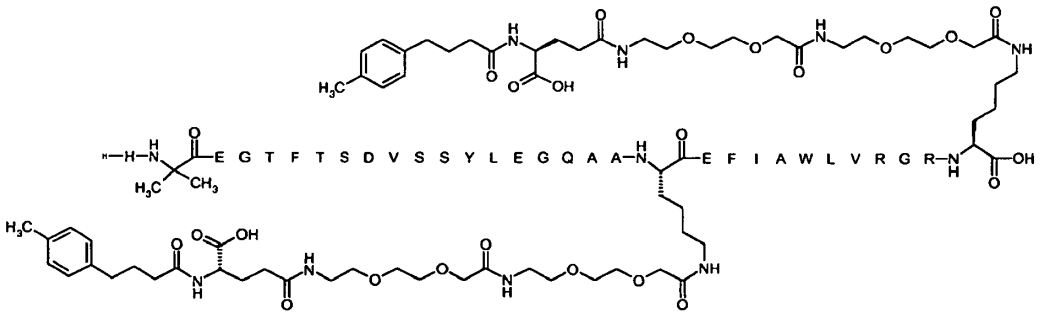


Método de preparación: SPPS método A, partiendo de resina Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, utilizándose Boc-His(Trt)-OH en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acopló ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech) dos veces seguido por Fmoc-Glu-OtBu y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082204) utilizando SPPS método A.
UPLC (método 05_B5_1): Rt = 4,95 min (92%).
LCMS4: m/z = 4011, calculado: 4011.

Ejemplo 18

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[4-(4-metilfenil)butirilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[4-(4-metilfenil)butirilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 37:

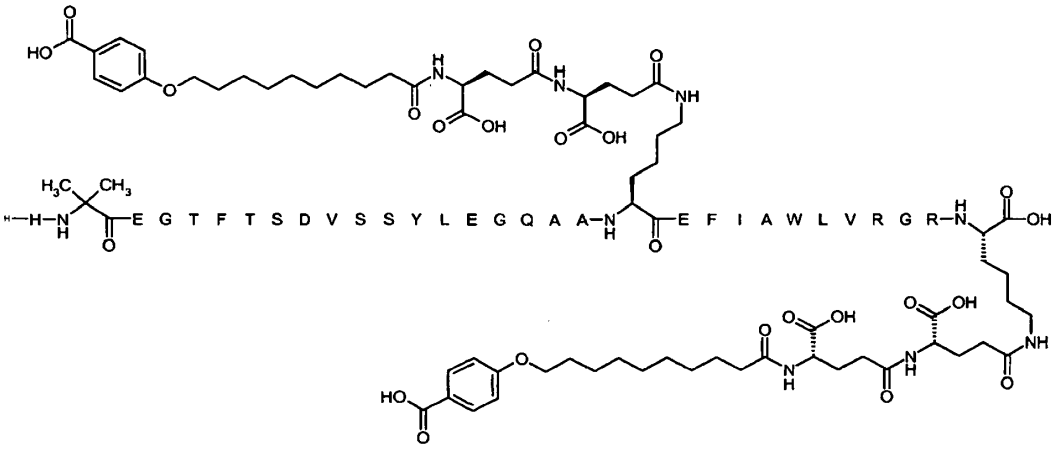


Método de preparación: SPPS método B, se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), ácido 4-(4-metiR$_F$enil)butírico (disponible comercialmente de ADCR) y Fmoc-Glu-OtBu utilizando SPPS método D.
UPLC (método 01_B4_1): Rt = 9,93 min
LCMS4: Rt = 2,44 min, m/z = 926 (m/5), 1157 (m/4), 1543 (m/3).

Ejemplo 19

***N*$^{\varepsilon 26}$-((S)-4-Carboxi-4-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril), *N*$^{\varepsilon 37}$-((S)-4-Carboxi-4-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 38:

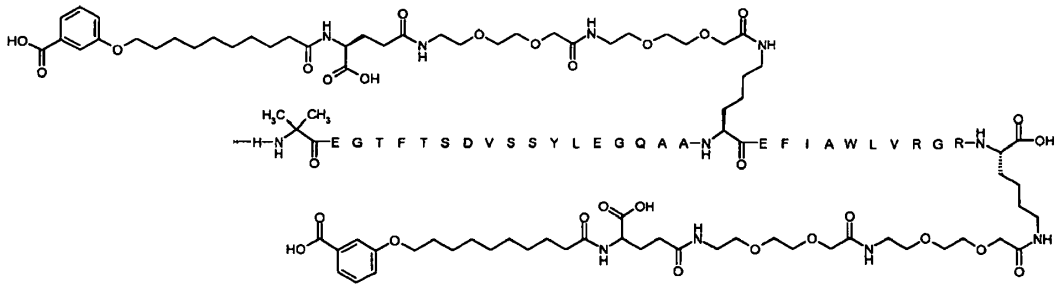


Preparación: SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, utilizándose Boc-His(Trt)-OH en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acoplaron Fmoc-Glu-OtBu y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082204) utilizando SPPS método D.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 8,6 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 7,9 min
LCMS4: 4565,0
MW calculado = 4166,1.

Ejemplo 20

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-Carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{4-Carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{B},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37)**

Chem. 39:



Preparación de éster *terc*-butílico de ácido 3-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico

Se disolvió éster *terc*-butílico de ácido 3-hidroxi-benzoico (3 g) en acetonitrilo (50 ml). Se añadió éster metílico de ácido 10-bromo-decanoico de Aldrich (4,1 g) en acetonitrilo (20 ml) y se lavó la vasija con acetonitrilo (30 ml). Se añadió carbonato de potasio y la mixtura se mantuvo a reflujo bajo nitrógeno durante aprox 18 horas. La reacción se enfrió y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en AcOEt (80 ml) y agua (30 ml) y se extrajo. La fase acuosa se lavó con AcOEt (30 ml) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua (50 ml), NaCl saturado (30 ml) y se secaron sobre $MgSO_4$, después de lo cual se concentró el filtrado a vacío para dar un sólido blanco (5,8 g). El residuo se disolvió en DCM (15 ml) y se añadió heptano (aprox. 60 ml), y la solución se concentró a aprox. 30 ml. Después de agitar durante 30 min, comenzaron a formarse cristales, y la solución se enfrió en hielo. Los cristales se separaron por filtración y se lavaron con heptano enfriado, después de lo cual se secaron a vacío para dar 4,13 g (71%) de éster *terc*-butílico de ácido 3-(9-metoxicarbonil-noniloxi)-benzoico.

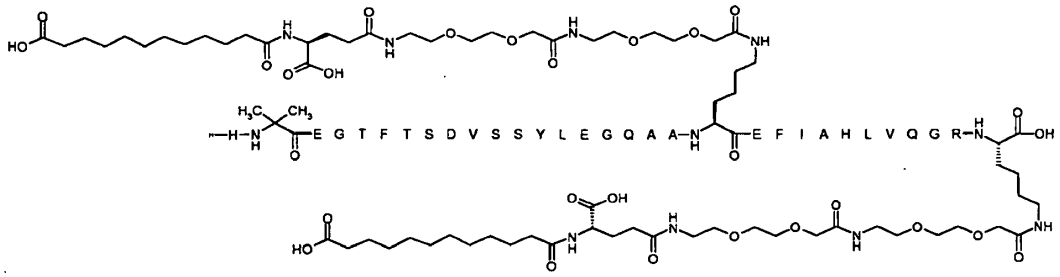
Los cristales se disolvieron en THF (30 ml) y se añadió NaOH 1N (11 ml). La solución turbia se agitó durante 16 horas. La mixtura de reacción se concentró para separar la mayor parte del THF, y la solución acuosa restante se extrajo con AcOEt (25 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentración a sequedad para dar un sólido semicristalino blanco (3,97 g). LCMS2: 401 (M+23), H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 7.56 (d, 1 H), 7,50 (m, 1 H), 7,26-7,32 (m, 1 H), 7,05 (dd, 1 H),3,99 (t, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,75-1,82 (m, 2H), 1,62-1,65 (m, 2H), 1,59 (s, 9H), 1,42-1,47 (m, 2H), 1,33 (br, 8H).

Método de preparación: SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, utilizándose Boc-His(Trt)-OH en posición 7. El Mtt se eliminó con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu, y éster *terc*-butílico de ácido 3-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico utilizando un método de acoplamiento doble en el sintetizador de péptidos Liberty.
UPLC (método 04_A4_1): 10,01 min
UPLC (método 08_B4_1): 8,81 min
LCMS4: m/z = 978,5 $(M+5H)^{5+}$, 1222,8 $(M+4H)^{4+}$, 1630,1 $(M+3H)^{3+}$

Ejemplo 21

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetilo], *N*$^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]-etoxi}etoxi)acetil][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 40:

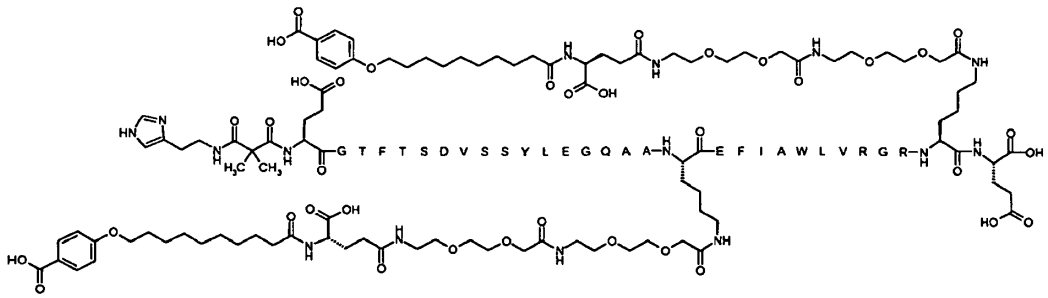


Método de preparación: Como en el Ejemplo 5.
La masa molecular teórica de 4655,2 se confirmó por MALDI
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 7,72 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 5,70 min

Ejemplo 22

N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)etilcarbamoil]-2-metilpropionil},$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino] butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Arg^{34}, Lys^{37}]- péptido GLP-1(9-37)Glu^{38}

Chem. 41:

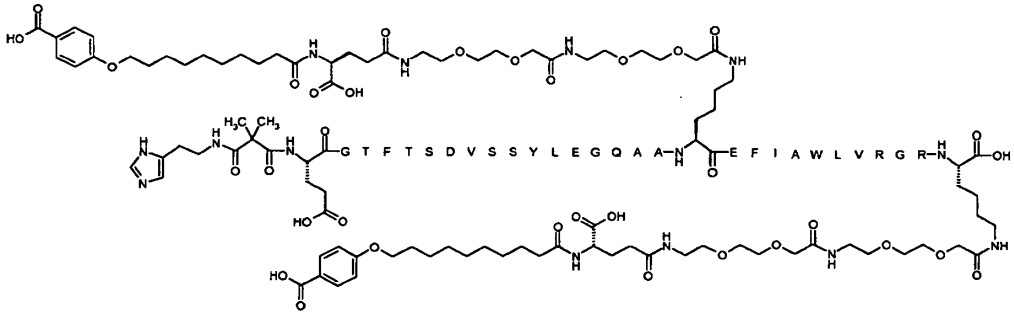


Preparación: SPPS método B. Se acopló ácido 2,2-dimetil-*N*-[2-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-etil-malonámico utilizando las mismas condiciones de acoplamiento que en el aminoácido Aib. Se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu, y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082204) utilizando SPPS método D.
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 9,32 min,
LCMS4: Rt = 2,29 min,, m/z = 1669 (m/3), 1252 (m/4), 1001 (m/5).

Ejemplo 23

N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)etilcarbamoil]-2-metilpropionil}-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil} [Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37)

Chem. 42:

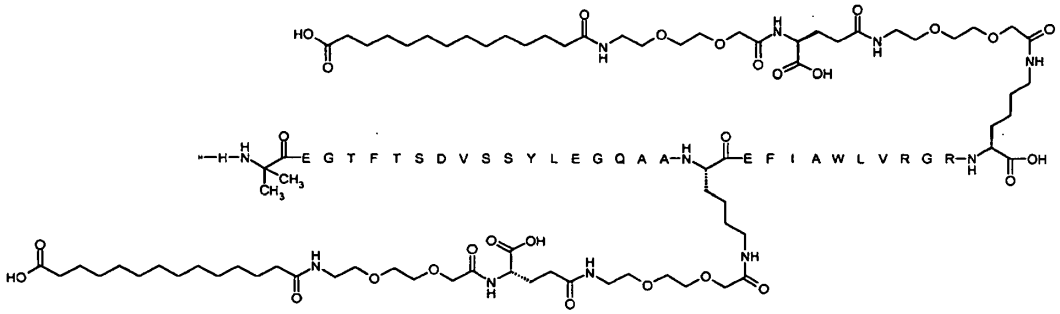


Preparación: SPPS método B. Se acopló ácido 2,2-dimetil-*N*-[2-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-etil]-malonámico utilizando la misma condición de acoplamiento que en el aminoácido Aib. Se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082204 utilizando SPPS método D,
UPLC (método 08_B4_1 (TFA)): Rt = 8,81 min
LCMS4: Rt = 2,29 min, m/z = 1625 (m/3), 1219 (m/4), 975 (m/5)

Ejemplo 24

$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)] etoxi}etoxi)acetilamino]butirilamino}etoxi) etoxi] acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]butirilamino} etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)

Chem. 43:

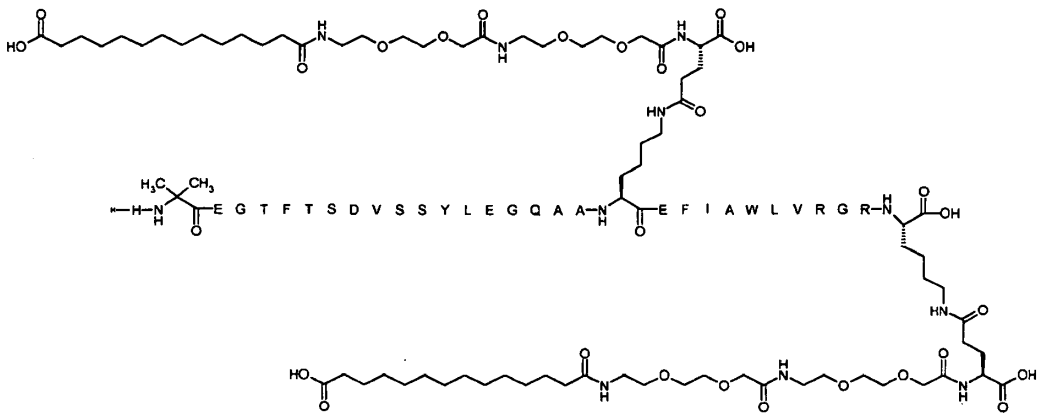


Preparación: SPPS método D, partiendo de Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, utilizándose Boc-His(Trt)OH en posición 7. Se eliminó el Mtt manualmente con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu, y tetradecanodioico utilizando un método de acoplamiento doble en el sintetizador de péptidos Liberty. La masa molecular teórica se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 8,6 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 9,7 min
MALDI-MS: 4788

Ejemplo 25

$N^{\varepsilon 26}$-[(S)-4-Carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)] etoxi}etoxi)acetilamino] etoxi) etoxi] acetil- amino}-butiril],$N^{\varepsilon 37}$-[(S)-4-Carboxi-4-{2-[2-(2-[2-(2-{2-[(13-carboxitridecanoilamino)]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi] acetilamino}butiril][Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)

Chem. 44:



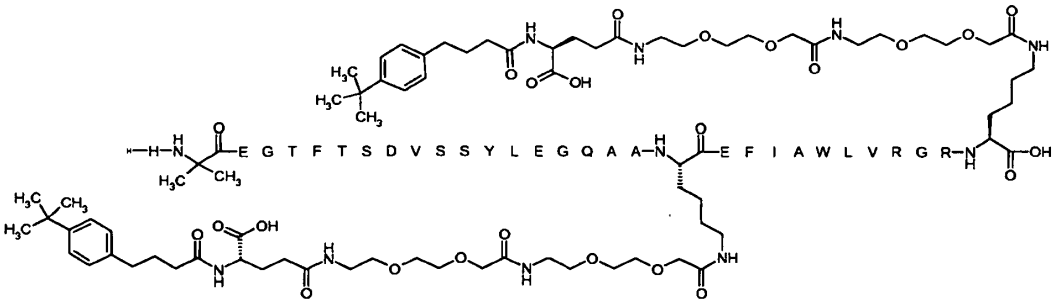
Preparación: SPPS método B, partiendo de Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja. Se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH en posición 26, utilizándose Boc-His(Trt)OH en posición 7. El Mtt se eliminó manualmente con HFIP, y se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-

OtBu, y tetradecanodioico utilizando un método de acoplamiento doble en el sintetizador de péptidos Liberty. La masa molecular teórica se confirmó por MALDI-MS.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 8,8 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 10 min
MALDI-MS: 4787

Ejemplo 26

***N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butil-fenil)-butirilamino]-4-carboxi-butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butil-fenil)-butiril-amino]-4-Carboxi-butirilamino}-etoxi)-etoxi]acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acetil} [Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)**

Chem. 45:

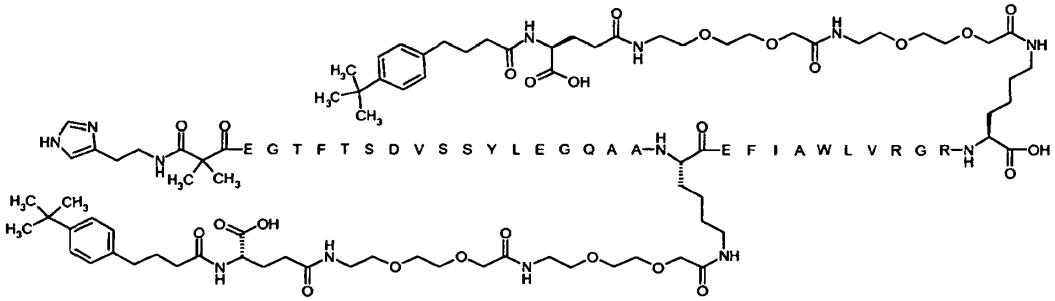


Preparación: SPPS método B. Se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), ácido 4-(4-*t*-butiR$_F$enil)butírico y Fmoc-Glu-OtBu utilizando SPPS método D.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 9,07 min
LCMS4: Rt = 2,29 min, m/z = 943 (m/5) 1179 (m/4) 1571 (m/3)

Ejemplo 27

***N*^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)-etilcarbamoil]-2-metilpropionil}-*N*$^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butilfenil)butirilamino]-4-Carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, *N*$^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-[4-(4-*terc*-butilfenil)-butirilamino]-4-Carboxibutirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil} [Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37)**

Chem. 46:

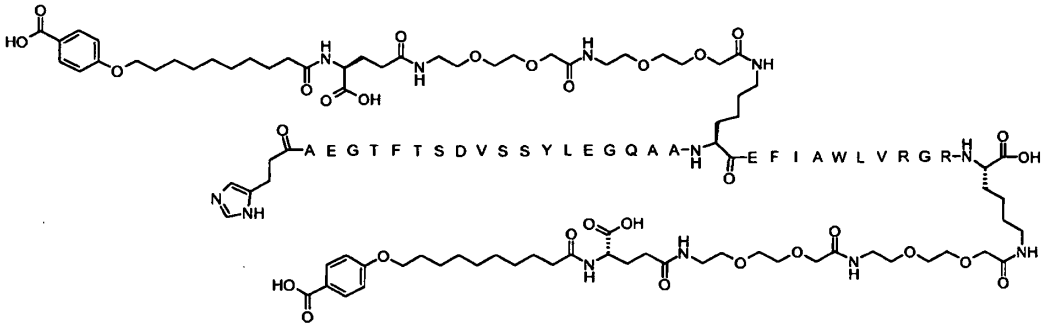


Preparación: SPPS método B. Se acopló ácido 2,2-dimetil-*N*-[2-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-etil]-malonámico utilizando las mismas condiciones de acoplamiento que para el aminoácido Fmoc-Aib. Se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu y ácido 4-(4-*t*-butiR$_F$enil)butírico utilizando SPPS método D.
UPLC (método 04_A4_1): Rt = 10,56 min
LCMS4: Rt = 2,40 min, m/z = 940(m/5), 1174(m/4), 1565(m/3)

Ejemplo 28

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi) decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-Carboxifenoxi) decanoilamino]butanoil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp^{7},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)**

Chem. 47:

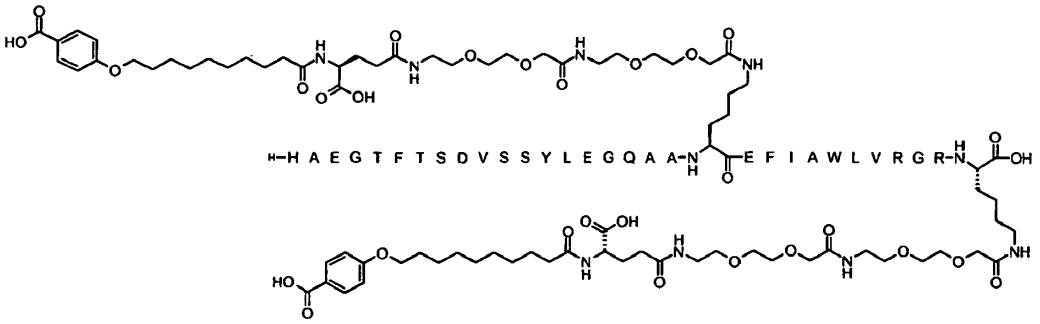


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 2,22 min, m/z: 4859,5; 1214,9 $(M+4H)^{4+}$; 1619,8 $(M+3H)^{3+}$
UPLC (método : 08_B4_1): Rt = 8,88 min
UPLC (método : 04_A3_1): Rt = 9,28 min

Ejemplo 29

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 48:

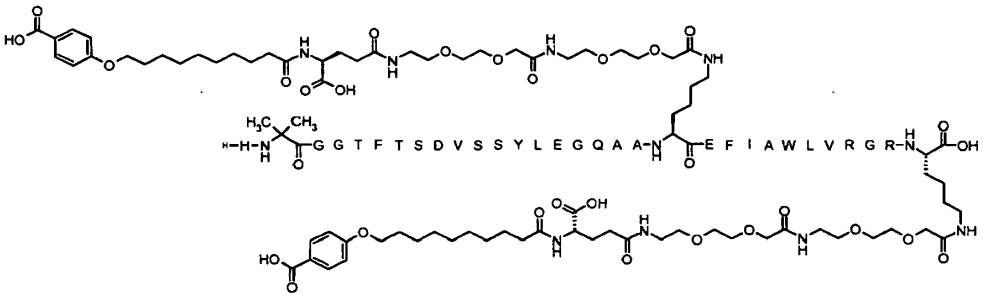


Método de preparación: SPPS método B.
UPLC (método 05_B5_1): Rt=5,75 min
UPLC (método 08_B2_1): Rt=13,09 min
LCMS4 (m/5)+1= 976; (m/4)+1= 1219; Exact mass = 4874

Ejemplo 30

$N^{\varepsilon 26}$-2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Gly9,Arg34,Lys37]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 49:



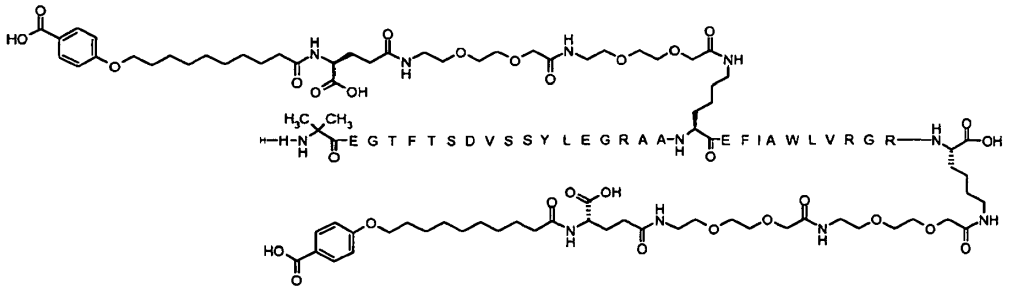
Método de preparación: SPPS método A.

UPLC (método 09_B2_1): Rt = 13,20 min
UPLC (método 05_B5_1): Rt = 6,05 min
LCMS4: (m/5)+1 = 964; (m/4)+1 = 1204; Masa exacta = 4816

Ejemplo 31

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{23},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 50:

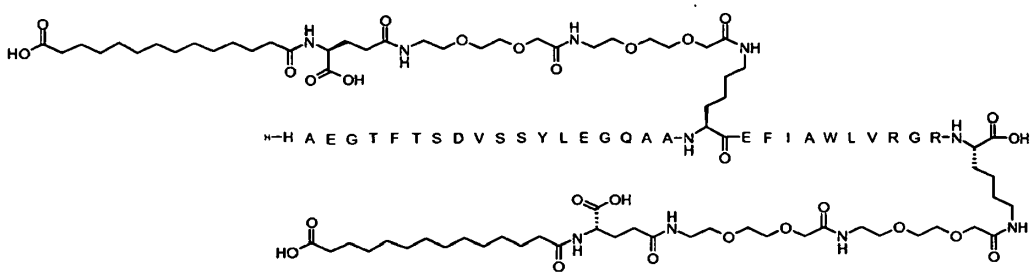


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt = 2,12 min, m/z: 4916,0
UPLC (método: 08_B2_1): Rt = 12,59 min
UPLC (método: 04_A3_1): Rt = 10,57 min

Ejemplo 32

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg34,Lys37]- péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 51:

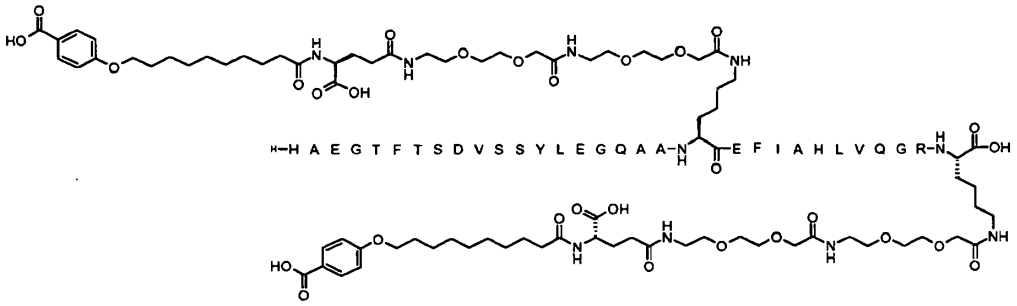


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt = 2,12 min, m/z: 4774,4
UPLC (método: 09_B2_1): Rt =12,87 min
UPLC (método: 04_A3_1): Rt = 8,86 min

Ejemplo 33

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 52:

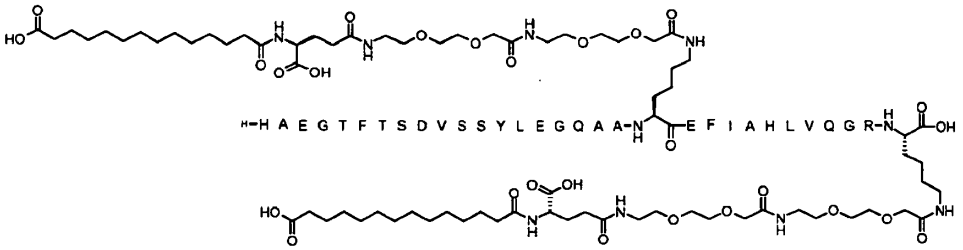


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: = 1,92 min, m/z: 4797,3; m/4: 1199,8; m/3: 1599,4
UPLC (método: 09_B4_1): Rt = 8,12 min
UPLC (método: 05_B8_1): Rt = 2,03 min

Ejemplo 34

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 53:

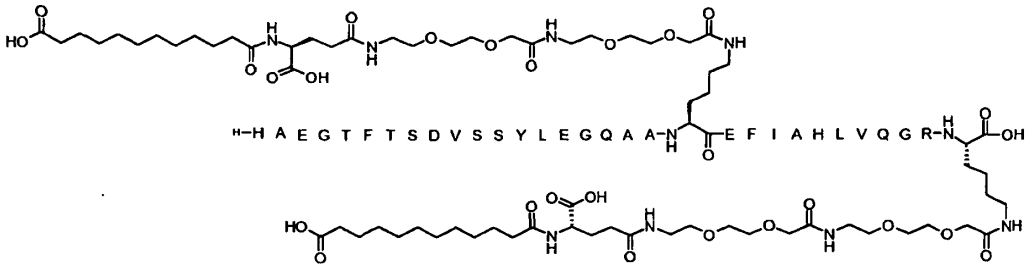


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt = 1,99 min, m/z: 4697,0
UPLC (método: 09_B2_1) Rt =12,20 min
UPLC (método: 05_B5_1): Rt = 5,31 min

Ejemplo 35

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 54:



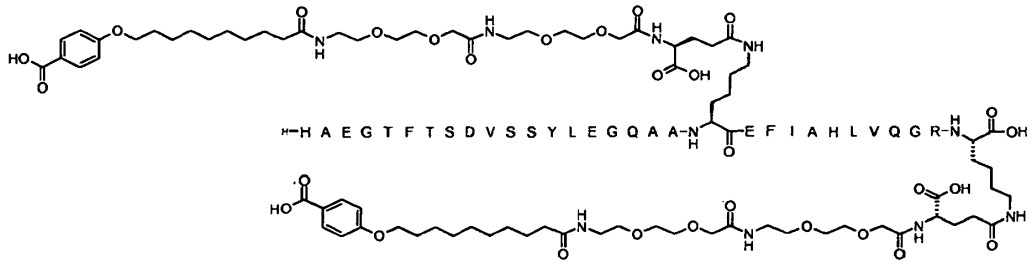
Método de preparación: SPPS método B.

LCMS4: Rt = 1,89 min, m/z: 4641,2
UPLC (método: 09_B2_1): Rt = 11,2 min
UPLC (método: 05_B5_1): Rt = 4,00 min

Ejemplo 36

$N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]butanoil], $N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 55:

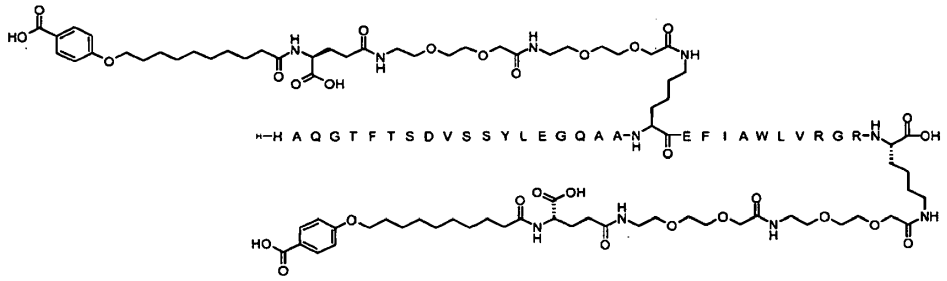


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 1,97 min, m/z: 4797,3; m/4: 1199,8; m/3:1599,4
UPLC (método: 09_B4_1): Rt = 8,24 min
UPLC (método: 05_B8_1): Rt = 2,88 min

Ejemplo 37

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Gln^{9},Arg^{34},Lys^{37}]- GLP-1-(7-37)

Chem. 56:

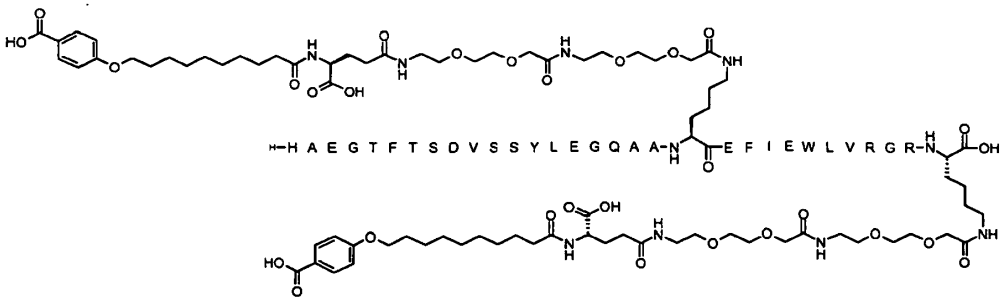


Método de preparación: SPPS método E.
LCMS4: Rt = 1,06 min, m/z: 4873,3
UPLC (método: 09_B2_1): Rt = 13,18 min
UPLC (método: 05_B5_1): Rt = 6,40 min

Ejemplo 38

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu^{30},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 57:

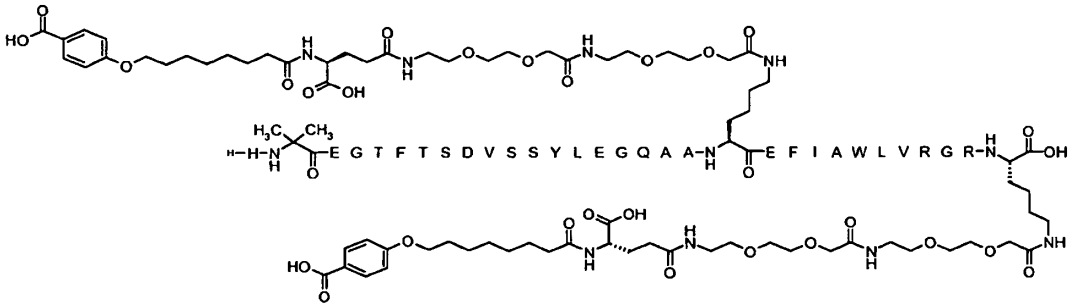


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt = 2,13 min, m/z: 4932,7
UPLC (método: 09_B2_1): Rt = 13,39 min
UPLC (método: 04_A3_1): Rt = 8,20 min

Ejemplo 39

***N*$^{\varepsilon 26}$[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)**

Chem. 58:

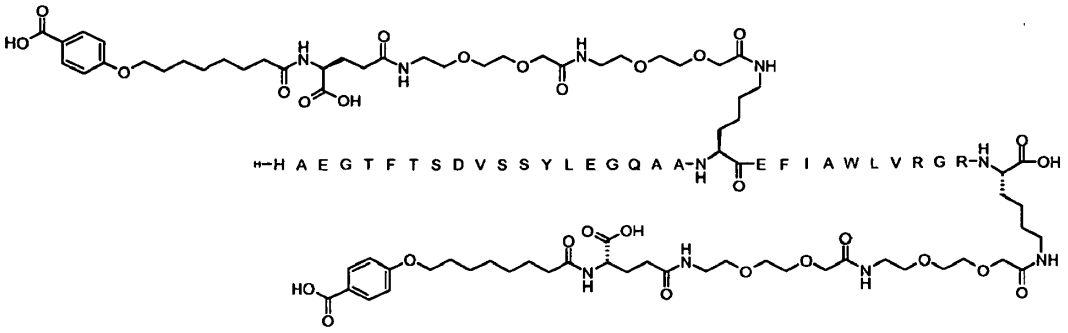


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 1,93 min, m/z: 4832,4; m/4: 1208,5; m/3: 1611,0
UPLC (método 09_B4_1): Rt = 8,10 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 8,15 min
UPLC (método 05_B5_1): Rt = 5,30 min

Ejemplo 40

N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-arboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 59:

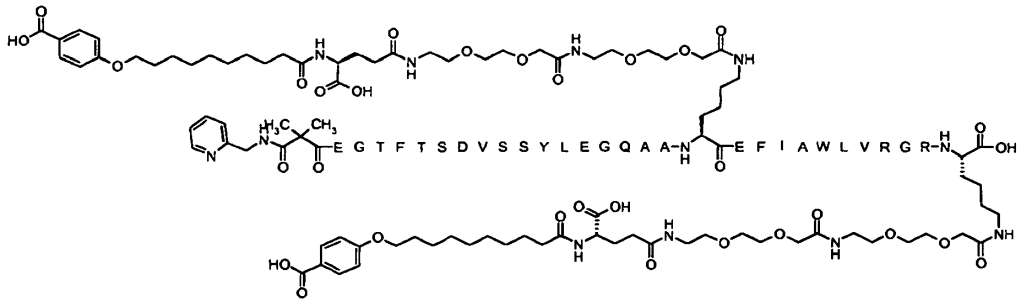


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 1,92 min, m/z: 4818,4; m/4: 1205,0; m/3: 1606,7
UPLC (método 09_B4_1): Rt = 8,06 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 8,02 min

Ejemplo 41

N{9}-[2,2-dimetil-3-oxo-3-(piridin-2-ilmetilamino)propanoil], N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(9-37)

Chem. 60:

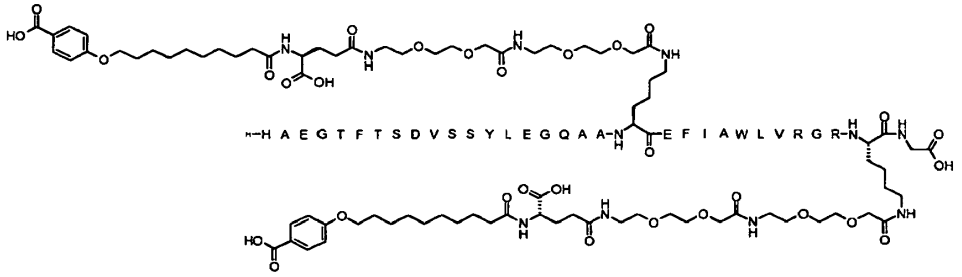


Método de preparación: SPPS método B. Se acopló ácido 2,2-dimetil-*N*-piridin-2-ilmetil-malonámico utilizando las mismas condiciones de acoplamiento empleadas para ácido 2,2-dimetil-*N*-[2-(1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)-etil]-malonámico en los ejemplos anteriores. Se acoplaron ácido Fmoc-Glu-OtBu y éster *terc*-butílico de ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico (preparado como se describe en el Ejemplo 25, paso 2 de WO 2006/082904) utilizando SPPS método D.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 8,98 min
LCMS4: Rt = 2,23 min, m/z = 1624(m/3), 1218 (m/4)

Ejemplo 42

***N*$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)- Gly**

Chem. 61:

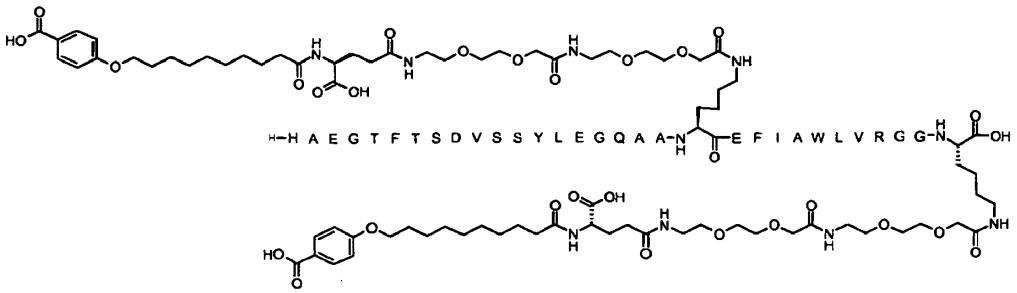


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 2,05 min, m/z: 4931,5; m/4: 1233,3; m/3: 1644,4
UPLC (método 09_B4_1): Rt = 8,52 min
UPLC (método 05_B5_1): Rt = 5,18 min
UPLC (método 04_A3_1): Rt = 9,24 min

Ejemplo 43

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Gly^{36},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 62:

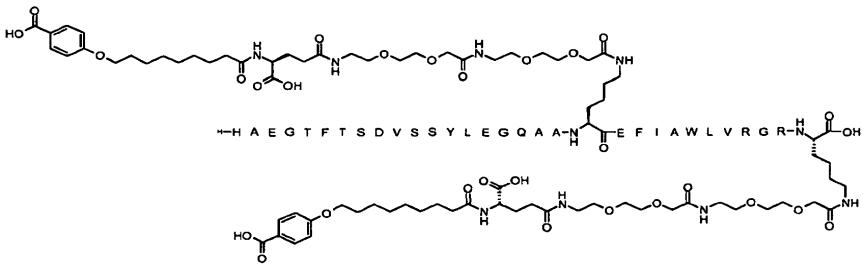


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 2,18 min, m/z: 4775,3; m/4: 1194,5; m/3: 1592,4
UPLC (método : 09_B4_1): Rt = 9,01 min
UPLC (método : 04_A3_1): Rt = 9,60 min
UPLC (método : 05_B5_1): Rt = 5,88 min

Ejemplo 44

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[9-(4-Carboxifenoxi)nonanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[9-(4-Carboxifenoxi)nonanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 63:

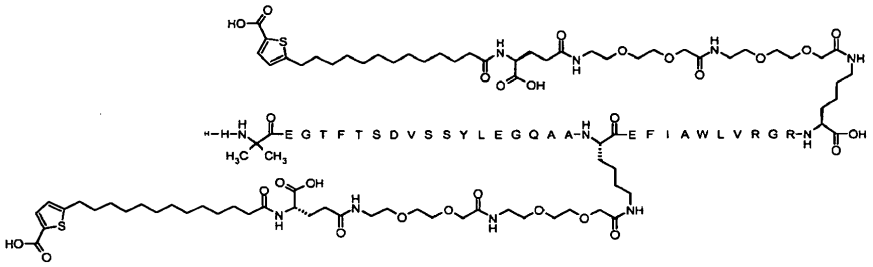


Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 2,03 min, m/z: 4846,4; m/4: 1212,3; m/3: 1616,1
UPLC (método : 09_B4_1): Rt = 8,27 min
UPLC (método : 05_B5_1): Rt = 5,09 min

Ejemplo 45

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[13-(5-carboxitiofeno-2-il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[13-(5-carboxitiofeno-2-il)tridecanoilamino]-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

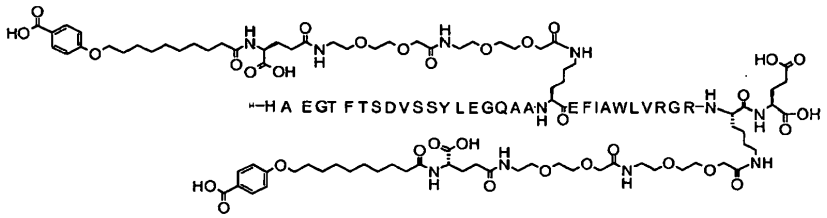
Chem. 64:



Método de preparación: SPPS método B. Se acoplaron ácido 8-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxaoctanoico (disponible comercialmente de Iris Biotech), Fmoc-Glu-OtBu, y éster *terc*-butílico de ácido 5-(12-carboxi-dodecil)-tiofeno-2-carboxílico (preparado como se describe en el ejemplo 6 de WO 07128815) utilizando el método SPPS método D en el sintetizador Liberty.
UPLC (método 08_B4_1): Rt = 9,87 min
LCMS4: m/z =1651(m/3), 1239 (m/4), 991 (m/5)

Ejemplo 46
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]--péptidil GLP-1-(7-37)- Glu

Chem. 65:

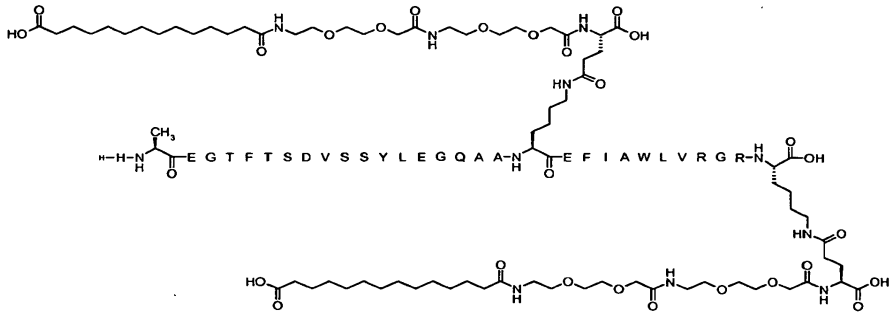


Método de preparación: SPPS método A.
UPLC (método 10_B14_1): Rt = 6,54 min
LCMS4: (m/5)+1 = 1001; (m/4)+1 = 1251; Masa exacta = 5003,5

Ejemplo 47

$N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]butanoil], $N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 66:

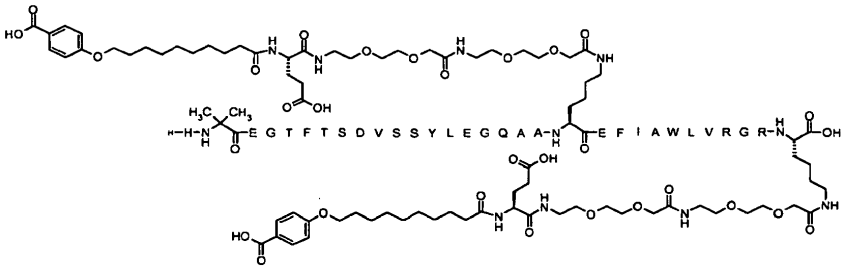


Método de preparación: SPPS método B.
UPLC (método: 09_B4_1): Rt = 8,76 min,
UPLC (método: 04_A6_1): Rt = 6,02 min,
LCMS4: Rt = 2,12 min, m/z: 4775; m/4 = 1194; m/5 = 955

Ejemplo 48

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4-Carboxi-2-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4-Carboxi-2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 67:

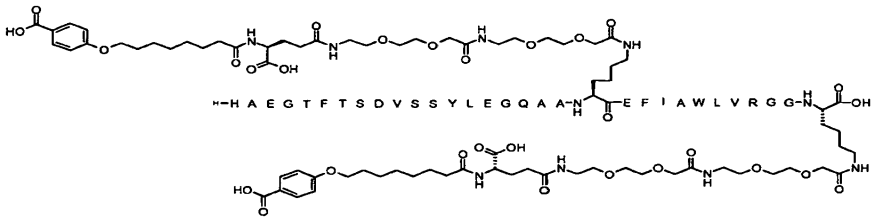


Método de preparación: SPPS método B.
UPLC (método: 08_B2_1): Rt = 13,193 min
UPLC (método: 05_B5_1): Rt = 6,685 min
LCMS4: m/z: 4887; m/3:1630; m/4:1222; m/5:978

Ejemplo 49

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg34,Gly36,Lys37]-péptido GLP-1-(7-37)

Chem. 68:



Método de preparación: SPPS método B.
LCMS4: Rt: 2,07 min, m/z: 4719,2; m/4: 1180,5; m/3: 1573,7
UPLC (método: 08_B4_1): Rt = 8,45 min
UPLC (método: 05_B5_1): Rt = 5,19 min

MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

Ejemplo 50: Potencia in vitro

El propósito de este ejemplo es testar la actividad, o potencia, de los derivados de GLP-1 in vitro.

Las potencias de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-49 se determinaron como se describe a continuación, es decir como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contenía membranas que expresaban el receptor de GLP-1 humano.

Principio

Membranas plasmáticas purificadas de un linaje de células transfectadas estables, BHK467-12A (tk-ts13), que expresaban el vector de GLP-1 humano se estimularon con el análogo de GLP-1 o derivado en cuestión, y se midió la potencia de producción cAMP utilizando el Kit de Ensayo de cAMP AlphaScreen de Perkin Elmer Life Sciences. El principio básico del Ensayo AlphaScreen es una competición entre cAMP endógeno y biotina-cAMP añadido exógenamente. La captura de cAMP se realiza utilizando un anticuerpo específico conjugado a Cuentas Aceptoras.

Cultivo de células y preparación de membranas

Un linaje de células transfectadas estables y un clon de expresión alta se seleccionaron para cribado. Las células se cultivaron con 5% de CO_2 en DMEM, 5% FCS, 1% Pen/Strep (Penicilina/Estreptomicina) y 0,5 mg/ml del marcador de selección G418.

Las células a aproximadamente 80% de la confluencia se lavaron 2X con PBS y se recogieron con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilenodiaminatetraacético), se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se retiró el sobrenadante. Todos los pasos adicionales se llevaron a cabo en hielo. El sedimento de células se homogeneizó en el dispositivo UltraTurrax durante 20-30 s en 10 ml de Tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4), se centrifugó 15 min a 20.000 rpm y el sedimento se resuspendió en 10 ml de Tampón 2 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4). La suspensión se homogeneizó durante 20-30 s y se centrifugó 15 min a 20.000 rpm. La suspensión en Tampón 2, homogeneización y centrifugación se repitieron una vez y las membranas se resuspendieron en Tampón 2. La concentración de proteínas se determinó y las membranas se guardaron a -80ºC hasta su utilización.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con área 1/2, de fondo plano (Costar, cat. No: 3693). El volumen final por pocillo era 50 µL.

Soluciones y reactivos

Kit de Ensayo de cAMP AlphaScreen de Perkin Elmer Life Sciences (cat. NO: 6760625M); que contenía cuentas Aceptoras Anti-cAMP (10 U/µL), cuentas Donantes de estreptavidina (10 U/µL) y

cAMP biotinilado (133 U/µL).

Tampón AlphaScreen pH=7,4: TRIS-HCl 50 mM (Sigma, cat.no: T3253); HEPES 5 mM (Sigma, cat.no: H3375); $MgCl_2.6H_2O$ 10 mM (Merck, cat.no: 5833); NaCl 150 mM (Sigma, cat.no: S9625); 0.01% Tween (Merck, cat.no: 822184). Se añadió lo siguiente al Tampón AlphaScreen antes de su utilización (se indican las concentraciones finales): BSA (Sigma, cat. no. A7906): 0,1%; IBMX (Sigma, cat. no. I5879): 0,5 mM; ATP (Sigma, cat. no. A7699): 1 mM; GTP (Sigma, cat. no. G8877): 1 uM.

Estándar de cAMP (factor de dilución en el ensayo = 5): Solución de cAMP: 5 µL de un stock de cAMP 5 mM, + 495 µL de Tampón AlphaScreen.

Se prepararon series de dilución adecuadas en Tampón AlphaScreen del estándar de cAMP así como el análogo de GLP-1 o derivado a testar, v.g. las 8 concentraciones siguientes del compuesto GLP-1: 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} y 10^{-14}M, y u na serie de, v.g., 10-6 a $3x10^{-11}$ of cAMP.

Cuentas Membrana/Aceptor

Se utilizan membranas hGLP-1/BHK 467-12A; 6 µg/pocillo correspondientes a 0,6 mg/ml (la cantidad de membranas utilizadas por pocillo puede variar).

"Sin membranas": Cuentas Aceptoras (15 µg/ml final) en Tampón AlphaScreen.

"Membranas de 6 µg/pocillo": membranas + Cuentas Aceptoras (15 µg/ml final) en Tampón AlphaScreen.

Se añaden 10 µL de "Sin membranas" al estándar de cAMP (por pocillo en duplicados) y los controles positivo y negativo.

Se añaden 10 µL de "membranas de 6 µg/pocillo" a GLP-1 y análogos (por pocillo en duplicados/triplicados).

Control positivo: 10 µL de "Sin membranas" + 10 µL de Tampón AlphaScreen.

Control negativo: 10 µL de "Sin membranas" + 10 µL de solución stock de cAMP (50 µL).

Dado que las cuentas son sensibles a la luz directa, todas las manipulaciones se realizaron en la oscuridad (la oscuridad mayor posible), o bajo luz verde. Todas las diluciones se realizaron en hielo.

Procedimiento

1. Preparar el Tampón AlphaScreen
2. Disolver y diluir el GLP-1/análogos/cAMP estándar en Tampón AlphaScreen.
3. Preparar la solución de Cuentas Donantes e incubar 30 min a RT.
4. Añadir la mixtura cAMP/GLP-1/análogos a la placa: 10 µL por pocillo.
5. Preparar la solución membrana/Cuentas Aceptoras y añadir ésta a las placas (10 µL por pocillo).
6. Añadir las Cuentas Donantes: 30 µL por pocillo.
7. Envolver la placa en lámina delgada de aluminio e incubar en el aparato de sacudidas durante 3 horas (muy lentamente) a RT.
8. Contar en AlphaScreen - cada placa antes de los incubados en el AlphaScreen durante 3 minutos antes del conteo.

Resultados

Se calcularon los valores DE_{50} [pM] utilizando el software Graph-PadPrism (versión 5).

Se confirmó la potencia de todos los derivados in vitro. 43 derivados tenían una potencia in vitro satisfactoria correspondiente a un valor CE_{50} de 2000 pM o menor; 42 derivados eran aún más potentes, teniendo un valor CE_{50} de 1000 pM o menor; 35 derivados tenían una potencia mayor aún, correspondiente a un valor CE_{50} de 500 pM o menor; 19 derivados eran muy potentes, correspondiendo a un valor CE_{50} de 200 pM o menor; y 10 derivados tenían una potencia muy satisfactoria, correspondiente a un valor CE_{50} de 100 pM o menor.

Para comparación, el compuesto No. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, No. 9. p. 1664-669 (GLP-1 (7-37) acilado en $K^{26,34}$ con bis-C12-diácido) tenía una potencia in vitro correspondiente a un valor CE_{50} de 1200 pM.

Si se desea, la multiplicidad de variación en relación con GLP-1 puede calcularse como CE_{50} (GLP-1)/CE_{50} (análogo) - 3693,2.

Ejemplo 51: Fijación del receptor de GLP-1

El propósito de este experimento es investigar la fijación del receptor de GLP-1 de los derivados de GLP-1, y el modo en que la fijación se ve influida potencialmente por la presencia de albúmina. Esto se realiza en un experimento in vitro como se describe a continuación.

La afinidad de fijación de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-49 para el receptor humano de GLP-1 se midió por su capacidad para desplazamiento de ^{125}I-GLP-1 del receptor. Se incluyeron liraglutida y semaglutida como compuestos comparativos. Con objeto de testar la fijación de los derivados a albúmina, el ensayo se realizó con una concentración baja de albúmina (0,005%) - correspondiente a la cantidad residual de la misma en el trazador), así como con una concentración alta de albúmina (adición de 2,0%). Un cambio en la afinidad de fijación, CI_{50}, es una indicación de que el péptido en cuestión se fija a albúmina, y por tanto una predicción de un perfil farmacocinético prolongado potencial del péptido en cuestión en modelos animales.

Condiciones

Especie (in vitro): Hámster
Punto Final Biológico: Fijación del Receptor
Método de Ensayo: SPA
Receptor: Receptor de GLP-1
Linaje de células: BHK tk-ts13.

Cultivo de células y purificación de membranas

Se seleccionaron para cribado un linaje de células transfectadas estables y un clon de alta expresión. Las células se cultivaron con 5% de CO_2 en DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep (Penicilina/Estreptomicina) y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418.

Las células (aproximadamente 80% de confluencia) se lavaron dos veces en PBS y se recogieron con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilenodiaminatetraacético), después de lo cual se separaron las mismas por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Las células y el sedimento de células deben mantenerse en hielo durante el mayor tiempo posible en los pasos subsiguientes. El sedimento de células se homogeneizó con UltraTurrax durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada de Tampón 1 (dependiendo de la cantidad de células, pero v.g. 10 ml). El homogeneizado se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió (homogeneizó) en 10 ml de Tampón 2 y se centrifugó de nuevo. Este paso se repitió una vez más. El sedimento resultante se resuspendió en Tampón 2, y se determinó la concentración de proteínas. Las membranas se guardaron a -80ºC.

Tampón 1: Na-HEPES 20 mM + EDTA 10mM, pH 7,4
Tampón 2: Na-HEPES 20 mM + EDTA 0,1mM, pH 7,4

Ensayo de fijación:
SPA:

Los compuestos de test, membranas, partículas de SPA y [^{125}I]-GLP-1 (7-36) NH_2 se diluyeron en tampón de ensayo. Se añadieron 25 µL (microlitros) de compuestos de test se añadieron a Optiplate. Se añadió HSA (50 µL) (experimento de "albúmina alta" que contenía 2% HSA), o tampón ((experimento de "albúmina baja", que contenía 0,005% de HSA). Se añadieron 5-10 µg de proteína/muestra (50 µL) correspondiente a 0,1-0,2 mg de proteína/ml (que se optimizó preferiblemente para cada preparación de membrana). Se añadieron partículas de SPA (cuentas SPA de aglutinina de germen de trigo, Perkin Elmer, #RPNQ0001) en una cantidad de 0,5 mg/pocillo (50 µL). La incubación se inició con [^{125}I]-GLP-1 (7-36) NH_2 (concentración final 0,06 nM correspondiente a 49,880 DPM, 25 µL). Las placas se sellaron con Sellador de Placas) y se incubaron durante 120 minutos a 30ºC mientras se agitaba con sacudidas. Las placas se centrifugaron (1500 rpm, 10 min) y se contaron en el dispositivo Topcounter).

Tampón de ensayo:

HEPES 50 mM
EGTA 5 mM
MgCl2 V
0.005% Tween 20
pH 7,4
HSA era SIGMA A1653.

Cálculos

El valor CI_{50} se leyó de la curva como la concentración que desplaza el 50% de ^{125}I-GLP-1 del receptor, y se determinó la ratio de [(CI_{50}/nM)HSA alta]/[(CI_{50}/nM)HSA ultrabaja].

Generalmente, la fijación al receptor de GLP-1 a concentración de albúmina baja debería ser lo mejor posible, correspondiendo a un valor CI_{50} bajo.

El valor CI_{50} para concentración alta de albúmina es una medida de la influencia de albúmina en la fijación del derivado al receptor de GLP-1. Como se muestra, los derivados de GLP-1 se fijan también a albúmina. Éste es un efecto generalmente deseable, que prolonga su vida útil en plasma. Por tanto, el valor CI_{50} a albúmina alta será generalmente mayor que el valor CI_{50} a albúmina baja, correspondiendo a una fijación reducida al receptor de GLP-1, causada por la fijación competitiva de albúmina con la fijación al receptor de GLP-1.

Una ratio alta (valor CI_{50} (albúmina alta)/ valor CI_{50} (albúmina baja)) puede tomarse como indicación de que el derivado en cuestión se fija bien a albúmina (puede tener una semivida larga), y se fija también satisfactoriamente *per se* al receptor de GLP-1 (el valor CI_{50} (albúmina alta) es alto, y el valor CI_{50} (albúmina baja) es bajo).

Resultados

Se obtuvieron los resultados siguientes, donde "ratio" se refiere a [(CI_{50}/nM)HSA alta]/[(CI_{50}/nM)HSA baja]:

Todos los derivados menos dos tenían una ratio superior a 1,0; la de 40 derivados era superior a 10; 34 derivados tenían una ratio superior a 25; 22 derivados tenían un valor superior a 50; 11 derivados tenían un valor superior a 100; y 3 derivados tenían una ratio superior a 250.

Adicionalmente, en lo que respecta al valor CI_{50} (albúmina baja), todos los derivados tenían un valor CI_{50} (albúmina baja) inferior a 600 nM; todos menos uno tenían un valor inferior a 500 nM; 46 derivados tenían un valor inferior a 100 nM; 44 derivados tenían un valor inferior a 50,00 nM; 34 derivados tenían un valor inferior a 10,00 nM; 23 derivados tenían un valor inferior a 5,00 nM; y 7 derivados tenían un valor inferior a 1,00 nM.

Adicionalmente, en lo que respecta a CI_{50} (albúmina alta), todos los derivados tenían un valor CI_{50} (albúmina alta) a 1000,00 nM o inferior; 46 derivados tenían un valor inferior a 1000,00 nM; 39 derivados tenían un valor inferior a 500,00 nM; 7 derivados tenían un valor inferior a 100,00 nM; y 4 derivados tenían un valor inferior a 50,00 nM.

Ejemplo 52: Estimación de la biodisponibilidad oral

El propósito de este experimento es estimar la biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1.

A este fin, se estudió la exposición en plasma después de inyección directa en el lumen intestinal de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 2, 15-17, 21, 25, 32, 36-39, y 42-48 in vivo en ratas, como se describe a continuación.

Los derivados de GLP-1 se testaron en una concentración de 1000 µM en una solución de 55 mg/ml de caprato de sodio.

32 ratas macho Sprague Dawley con un peso corporal a su recepción de aproximadamente 240 g se obtuvieron de Taconic (Dinamarca) y se asignaron a los diferentes tratamientos por aleatorización simple, 4 ratas por grupo. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes del experimento y se sacrificaron por anestesia general (Hypnorm/Dormicum).

Los derivados de GLP-1 se administraron en el yeyuno en la parte proximal (10 cm distal al duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal al ciego). Se insertó en el yeyuno un catéter PE50 de 10 cm de longitud, se hizo avanzar al menos 1,5 cm en el interior del yeyuno, y se aseguró antes de la dosificación por ligadura alrededor del intestino y el catéter con sutura distal 3/0 a la punta para prevenir la fuga o el desplazamiento del catéter. El catéter se colocó sin jeringuilla y aguja y se administraron 2 ml de solución salina en el abdomen antes de cerrar la incisión con rapas de heridas.

Se inyectaron 100 µL del derivado de GLP-1 respectivo en el lumen del yeyuno a través del catéter con una jeringuilla de 1 ml. Subsiguientemente, se impulsaron 200 µL de aire en el lumen del yeyuno con otra jeringuilla para "lavar" el catéter. Esta jeringuilla se dejó conectada al catéter a fin de prevenir el flujo de retorno al catéter.

Se recogieron muestras de sangre (200 µL) a intervalos deseados (usualmente a veces 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min) en tubos de EDTA desde la vena de la cola y se centrifugaron 5 minutos, a 10.000 G, a 4ºC en el transcurso de 20 minutos. Se separó plasma (75 µL) a tubos Micronic, se congeló inmediatamente, y se mantuvo a -20ºC hasta que se analizó respecto a concentración en plasma del derivado de GLP-1 respectivo con LOCI (Ensayo de Luminiscencia por Canalización de Oxígeno), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247. Las cuentas de donantes se recogieron con estreptavidina, mientas que las Cuentas Aceptoras se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconocía un epítopo medio-/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el término N, se trató con biotina. Las tres sustancias reaccionantes se combinaron con el analito y formaron un inmuno-complejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberaba átomos de oxígeno singulete de las cuentas de donantes, que se canalizaron a las Cuentas Aceptoras y desencadenaron quimioluminiscencia, que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz era proporcional a la concentración del compuesto.

Después de la toma de muestras de sangre, las ratas se sacrificaron bajo anestesia y se abrió el abdomen para comprobar la colocación correcta del catéter.

Las concentraciones medidas (n = 4) en plasma (picomol/L) se determinaron en función del tiempo. La ratio de concentración en plasma (pmol/L) dividida por la concentración de la solución de dosificación (µmol/L) se calculó para cada tratamiento, y los resultados para t = 30 min (30 minutos después de la inyección del compuesto en el yeyuno) se evaluaron (exposición corregida por dosis a 30 min) como una medida sustitutiva de la biodisponibilidad intestinal. Se ha demostrado que la exposición corregida por dosis está correlacionada satisfactoriamente con la biodisponibilidad real.

Se obtuvieron los resultados siguientes, donde la exposición corregida por dosis a los 30 min se refiere a (la concentración en plasma 30 minutos después de la inyección del compuesto en el yeyuno (pM)), dividida por (la concentración del compuesto en la solución de dosificación (µM)):

Todos los derivados tenían una exposición corregida por dosis a 30 min superior a 40; 17 tenían un valor superior a 50; 14 eran superiores a 70; 11 eran superiores a 100; 6 eran superiores a 125; y 2 derivados eran superiores a 150.

Para comparación, el compuesto No. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, No. 9, p. 1664-669 (GLP-1 (7-37) acilado en $K^{26,34}$ con bis-C12-diácido) tenía una exposición corregida por dosis a los 30 min inferior a 40, y la exposición corregida por dosis a los 30 min para semaglutida estaba dentro del mismo intervalo inferior a 40.

Ejemplo 53: Efecto sobre glucosa en sangre y peso corporal

El propósito del estudio es comprobar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la glucosa en sangre (BG) y el peso corporal (BW) en una situación diabética.

Los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 2, 4-5, 17, y 29 se testaron en un estudio dosis-respuesta en un modelo de ratón obeso, diabético (ratones db/db) como se describe en lo que sigue.

Se incluyeron en el estudio 50 ratones db/db (Taconic, Dinamarca) alimentados desde su nacimiento con la dieta NIH31 (dieta de roedores NIH 31M disponible comercialmente de Taconic Farms, Inc., US, véase www.taconic.com) con una edad de 7-9 semanas. Los ratones tenían acceso libre a comida estándar (v.g. Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Dinamarca) y agua del grifo y se mantenían a 24ºC. Después de 1-2 semanas de aclimatación, la glucosa basal en sangre se evaluó dos veces en dos días consecutivos (a saber, a las 9 am). Los 8 ratones con los valores de nivel en sangre más bajo se excluyeron de los experimentos. Basándose en los niveles medios de glucosa en sangre, los 42 ratones restantes se seleccionaron respecto a experimentación ulterior y se asignaron a 7 grupos (n = 6) con niveles de glucosa en sangre coincidentes. Los ratones se utilizaron en experimentos con duración de 5 días hasta 4 veces. Después del último experimento, los ratones se sacrificaron por eutanasia.

Los 7 grupos recibieron tratamiento como sigue:

1: Vehículo, subcutáneo
2: Derivado de GLP-1, 0,3 nmol/kg, subcutáneo
3: Derivado de GLP-1, 1,0 nmol/kg, subcutáneo
4: Derivado de GLP-1, 3,0 nmol/kg, subcutáneo
5: Derivado de GLP-1, 10 nmol/kg, subcutáneo
6: Derivado de GLP-1, 30 nmol/kg, subcutáneo
7: Derivado de GLP-1, 100 nmol/kg, subcutáneo

Vehículo: Fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0,05% Tween 80, pH 7,4.

El derivado de GLP-1 se disolvió en el vehículo, a concentraciones de 0,05, 0,17, 0,5, 1,7, 5,0 y 17,0 nanomoles/ml. Los animales se dosificaron s.c. con una dosis volumétrica de 6 ml/kg (es decir 300 µL por ratón de 50 g).

El día de la dosificación, se evaluó la glucosa en sangre en el momento -½ h (8,30 am), pesándose los ratones después de ello. El derivado de GLP-1 se dosificó aproximadamente a las 9 am (tiempo 0). El día de la dosificación, se evaluó la glucosa en sangre en los momentos 1, 2, 4, y 8 h (10 am, 11 am, 1 pm y 5 pm).

Durante los días siguientes, se evaluó la glucosa en sangre en los momentos de 24, 48, 72, y 96 horas después de la dosificación (es decir, a las 9 am los días 2, 3, 4, 5). Cada día, se pesaron los ratones después de la toma de muestras para glucosa en sangre.

Los ratones se pesaron individualmente en una balanza digital.

Las muestras para la medida de glucosa en sangre se obtuvieron del capilar de la punta de la cola de los ratones conscientes. Se recogió sangre, 10 µL, en capilares heparinizados y se transfirió a 500 µL de tampón de glucosa (solución sistémica EKF, Eppendorf, Alemania). La concentración de glucosa se midió utilizando el método de glucosa-oxidasa (analizador de glucosa Biosen 5040, EKF Diagnostic, GmbH, Barleben, Alemania). Las muestras se mantuvieron a la temperatura ambiente durante hasta 1 hora hasta el análisis. En caso de tener que exponer el análisis, las muestras se mantuvieron a 4ºC durante un máximo de 24 h.

DE_{50} es la dosis que da lugar a un efecto semimáximo en nmol/kg. Este valor se calcula sobre la base de la capacidad de los derivados para reducir el peso corporal así como la capacidad para rebajar la glucosa en sangre, como se explica más adelante.

El valor DE_{50} para peso corporal se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo en delta BW 24 horas después de la administración s.c. del derivado. Por ejemplo, si la disminución máxima en peso corporal después de 24 horas es 4,0 g, entonces el peso corporal DE_{50} podría ser aquella dosis en nmol/kg que da lugar a una disminución del peso corporal después de 24 horas de 2,0 g. Esta dosis (peso corporal DE_{50}) puede leerse a partir de la curva dosis-respuesta.

El valor DE_{50} para glucosa en sangre se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre AUC delta BG 8 horas después de la administración s.c. del análogo.

El valor DE_{50} puede calcularse únicamente si existe una relación sigmoidal dosis-respuesta con una definición clara de la respuesta máxima. Así pues, si no ocurriera esto, el derivado en cuestión se ensaya de nuevo en una gama de dosis diferentes hasta que se obtiene la relación sigmoidal dosis-respuesta.

Se obtuvieron los resultados siguientes:

Los derivados testados tenían el efecto esperado sobre la glucosa en sangre así como sobre el peso corporal (una disminución en ambos casos). Adicionalmente, se obtuvo una curva sigmoidal dosis-respuesta que hacía posible el cálculo de los valores DE_{50} para glucosa en sangre y peso corporal, respectivamente, como se ha explicado arriba.

Ejemplo 54: Semivida en lechones

El propósito de este estudio es determinar la prolongación in vivo de los derivados de GLP-1 después de administración i.v. en lechones, es decir la prolongación de su tiempo de acción. Esto se realiza en un estudio farmacocinético (PK), en el que se determina la semivida terminal del derivado en cuestión. Por semi-vida terminal se entiende generalmente el periodo de tiempo necesario para reducir a la mitad cierta concentración en plasma, medida después de la fase inicial de distribución.

Se utilizaron en los estudios lechones macho Göttingen obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmose, Dinamarca) de aproximadamente 7-14 meses de edad y que pesaban desde aproximadamente 16-35 kg. Los lechones se alojaron individualmente y se alimentaron restrictivamente una vez o dos veces al día con dieta SDS de lechones (Special Diets Services, Essex, Reino Unido). Después de al menos dos semanas de aclimatación, se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudal o craneal de cada animal. Se dejó que los animales se mantuvieron durante una semana en recuperación después de la cirugía, y se utilizaron luego para estudios farmacocinéticos repetidos con un periodo de lavado adecuado entre dosificaciones.

Los animales se mantuvieron en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes de la dosificación y durante al menos 4 horas después de la dosificación, pero tenían acceso ad libitum a agua durante todo el periodo.

Los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 2, 4-5, 16-17, 25, 29 y 39 se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0,5% Tween 80, pH 7,4 a una concentración usual de 20-60 nanomol/ml. Se administraron inyecciones i.v. (correspondiendo el volumen a usualmente 1-2 nanomol/kg, por ejemplo 0,033 ml/kg) de los compuestos mediante un catéter, y la sangre se muestreó en momentos predefinidos hasta 13 días después de la dosificación (preferiblemente a través del otro catéter). Se recogieron muestras de sangre (por ejemplo 0,8 ml) en tampón de EDTA (8 mM) y se centrifugaron luego a 4ºC y 19242 g durante 10 minutos. El plasma se pipeteó a tubos Micronic en hielo seco, y se mantuvo a -20ºC hasta que fue analizado para concentración en plasma del compuesto GLP-1 respectivo utilizando ELISA o un ensayo similar basado en anticuerpos o LC-MS. Se analizaron los valores individuales de concentración en plasma-tiempo por un modelo no compartimental en WinNonlin v. 5,0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.), y se determinaron las semividas terminales resultantes (media armónica).

Resultados

Todos menos uno de los derivados ensayados tenían una semi-vida de al menos 12 horas, 6 de ellos tenían una semi-vida de al menos 24 horas, 5 tenían una semi-vida de al menos 36 horas, 3 tenían una semi-vida de al menos 48 horas, y dos tenían una semi-vida de al menos 60 horas.

Ejemplo 55: Efecto sobre la secreción de insulina mediada por glucosa

El propósito de este ejemplo es testar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la secreción de insulina mediada por glucosa.

Esto se realiza en lechones Göttingen utilizando un test de tolerancia a la glucosa i.v. (IVGTT).

Lechones Göttingen macho (lechones Ellegaard Göttingen A/S, Dalmrose, Dinamarca), de 7-14 meses de edad se utilizan en los estudios. Los animales se alojan en corrales individuales durante la aclimatación y durante los experimentos. Después de al menos dos semanas de aclimatación, se implantan dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudal o craneal en cada animal. Los animales se mantienen en recuperación durante 1 semana después de la cirugía, y se utilizan para estudios repetidos con un periodo de lavado adecuado entre dosificaciones.

Los cerdos se alimentan restrictivamente 1-2 veces al día con pienso SDS para lechones (Servicios de Dietas Especiales, Essex, Reino Unido) y se les permite acceso a agua ad libitum.

El efecto de los derivados de GLP-1 se testa después de una sola dosis o después de un periodo con escalación de la dosis a fin de evitar efectos adversos procedentes de dosis altas agudas. Los derivados de GLP-1 reciben i.v. o subcutáneo en la piel fina detrás de la oreja.

Para cada derivado de GLP-1 testado existe un grupo basal tratado con vehículo (o sin tratar) y 2-6 grupos de dosis GLP-1 correspondientes a 2-6 niveles diferentes de concentración en plasma, que son por regla general aproximadamente 3000-80.000 pM (n = 5-8).

Para cada derivado de GLP-1 se realiza un test de tolerancia a la glucosa i.v. de 1 ó 2 horas. Los cerdos se mantienen en ayunas durante aproximadamente 18 horas antes del experimento. La permeabilidad de los catéteres venosos centrales se comprueba, y se toman dos muestras basales de sangre. Después de ello, se administra i.v. la muestra de 0,3 g/kg de glucosa a los 0 minutos (glucosa 500 g/l, SAD) durante un periodo de 30 segundos y el catéter se lava abundantemente con 20 ml de NaCl estéril al 0,9%. Las muestras de sangre se toman usualmente en los momentos siguientes en relación con el bolus de glucosa: -10, -5, 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, ó 120 minutos, y después de cada muestra de sangre, el catéter se lava abundantemente con 20 ml de NaCl estéril al 0,9% con 10 U/ml de heparina. Las muestras de sangre para insulina, glucosa y concentraciones en plasma de los derivados se transfieren a tubos recubiertos con EDTA. Los tubos se guardan en hielo seco hasta centrifugación dentro de 1 hora (4ºC, 3000 rpm, 10 min), se pipetea el plasma en tubos Micronic sobre hielo seco y se guarda a -20ºC hasta su análisis. Dependiendo de la semivida del derivado de GLP-1, las concentraciones en plasma se miden a t = 0 min, o a t = 0 min y al final del test (t = 60 min, o t = 120 min). Se analiza la glucosa utilizando el método de glucosa-oxidasa conforme a las instrucciones del fabricante con 10 µL de plasma en 500 µL de tampón (EBIO + autoanalizador y solución, Eppendorf, Alemania). Se analiza la insulina utilizando un ensayo inmunométrico adecuado (tal como LOCI, véase v.g. Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247). La concentración en plasma del derivado de GLP-1 se analiza utilizando ELISA o un ensayo similar basado en anticuerpos o LC-MS.

Para cada estudio, se calcula el área bajo la curva de insulina (AUCinsulina) y se utiliza como una medida de la secreción de insulina. Los diferentes grupos de dosis se comparan con el grupo respectivo vehículo/línea base utilizando ANOVA de una sola vía u otro análisis estadístico apropiado. Puede calcularse también un valor CE_{50} para AUCinsulina.

Ejemplo 56: Efecto sobre la ingesta de alimento

El propósito de este experimento es investigar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la ingesta de alimento en los cerdos. Esto se realiza en un estudio farmacodinámico (PD) como se describe a continuación, en el cual se mide la ingesta de alimento 1, 2, 3, y 4 días después de la administración de una sola dosis del derivado de GLP-1, comparado con un grupo de control tratado con vehículo.

Se utilizan cerdos hembra Landrace-Yorkshire Duroc (LYD), de aproximadamente 3 meses de edad, que pesan aproximadamente 30-35 kg (n = 3-4 por grupo). Los animales se alojan en un grupo durante 1-2 semanas durante la aclimatación a las instalaciones animales. Durante el periodo experimental, los animales se colocan en corrales individuales desde el lunes por la mañana al viernes por la tarde para medida de la ingesta individual de alimento. Los animales se alimentan ad libitum con pienso para cerdos (Svinefoder, Antonio) en todo momento tanto durante la aclimatación como durante el periodo experimental. La ingesta de alimentos se monitoriza en línea por registro del peso de pienso cada 15 minutos. El sistema utilizado es Mpigwin (Ellegaard Systems, Faaborg, Dinamarca).

Los derivados de GLP-1 se disuelven en un tampón de fosfato (fosfato 50 mM, 0,05% Tween 80, pH 8) a concentraciones de 12, 40, 120, 400 ó 1200 nmol/ml correspondiente a dosis de 0,3, 1, 3, 10, ó 30 nmol/kg. El tampón de fosfato servía como vehículo. Los animales se dosifican con una sola dosis s.c. del derivado de GLP-1 o vehículo (volumen de dosis 0,025 ml/kg) durante la mañana del día 1, y se mide la ingesta de alimento durante 4 días después de la dosificación. El último día de cada estudio, 4 días después de la dosificación, se toma una muestra de sangre para medida de la exposición del plasma del derivado de GLP-1 del corazón en los animales anestesiados. Los animales se sacrifican después de ello por eutanasia con una sobredosis intra-cardiaca de pentobarbitona. Se analiza el contenido de plasma de los derivados de GLP-1 utilizando ELISA o un ensayo similar basado en anticuerpos.

La ingesta de alimento se calcula como valor medio de ingesta de alimento en 24 h ± SEM en los 4 días.

Se realizan comparaciones estadísticas de la ingesta de alimento durante 24 horas en el grupo de vehículo frente al grupo de derivado de GLP-1 en los 4 días, utilizando medidas repetidas ANOVA de una vía o dos vías, seguido por el post-test de Bonferroni.

Ejemplo 57: Estabilidad contra la degradación por las enzimas intestinales

El propósito de este ejemplo es testar la estabilidad contra la degradación por las enzimas intestinales. Se utilizó GLP-1 (7-37) en el ensayo como un tipo de estándar.

Se testaron todos los compuestos del ejemplo, excepto los compuestos de los Ejemplos 4, 6, 8, 34-35 y 49.

Las actividades proteolíticas más fuertes en el intestino son de origen pancreático e incluyen las serina-endopeptidasas tripsina, quimotripsina, y elastasa así como varios tipos de carboxipeptidasas

Se desarrolló y se utilizó un ensayo con extracto del intestino delgado de ratas como se describe a continuación.

Extractos de intestino delgado de rata

Se prepararon intestinos delgados de rata y se lavaron abundantemente con 8 ml de NaCl 150 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4. Las soluciones se centrifugaron durante 15 min a 4600 rpm en una centrífuga Heraeus Multifuge 3 S-R con un rotor 75006445. Los sobrenadantes se retiraron y se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm Millipore Millex GV PVDF. Los filtrados de varios animales se agruparon para calcular el promedio de las diferencias individuales.

El contenido de proteínas de los extractos obtenidos se determinó por el Ensayo Bradford (véase v.g. Analytical Biochemistry (1876), vol. 72, p. 248-254, y Analytical Biochemistry (1996), vol. 236, p. 302-308).

Ensayo de degradación

Se incubaron 2,5 nmol de los derivados a testar con el extracto intestinal en un volumen de 250 µL a 37ºC a lo largo de un periodo de una hora. Se ensayaron muestras intestinales en presencia de Hepes 20 mM de pH 7,4. La concentración del extracto intestinal se tituló en experimentos piloto de tal modo que la semivida (t ½) de GLP-1 (7-37) estaba comprendida en el intervalo de 10-20 minutos. El extracto del intestino delgado se utilizó a una concentración de 1,4 µg/ml. Todos los componentes, excepto el extracto intestinal se mezclaron y se precalentaron durante 10 minutos a 37ºC. Inmediatamente después de la adición del extracto intestinal, se tomó una muestra de 50 µL y se mezcló con el mismo volumen de ácido trifluoroacético (TFA) al 1%. Se tomaron muestras ulteriores de acuerdo con ello, después de 15, 30, y 60 minutos.

Análisis de las muestras

Análisis UPLC

Se analizaron 10 µL de las muestras por UPLC utilizando un sistema Waters Acquity con una columna DEH C18 de 1,7 µm, 2,1 x 50 mm y un gradiente de 30 a 65% de TFA al 0,1% y TFA al 0,07% en acetonitrilo durante 5 minutos a un caudal de 0,6 ml/min. Después de la sustracción de la línea base, se determinaron las integrales pico de los compuestos intactos en el cromatograma HPLC registrado a una longitud de onda de 214 nm.

Análisis MALDI-TOF

Se transfirió 1 µL de cada muestra a una diana Bruker/Eppendorf PAC HCCA 384 MALDI. El análisis se realizó con un espectrómetro de masas laser Autoflex asistido por matriz con analizador de tiempo de vuelo de desorción y ionización (MALDI-TOF), utilizando el método pre-definido "PAC_medida" con un intervalo de detección extendido de 500 a 5000 Da y el método de calibración pre-definido "PAC_calibrado".

Análisis de los datos

Las integrales de los picos de los cromatogramas HPLC se representaron gráficamente contra el tiempo. La semivida del compuesto respectivo se calculó por ajuste de los datos utilizando software SigmaPlot 9,0 y una ecuación para una decadencia exponencial de 2 parámetros.

Para cada compuesto testado, se calculó la semivida relativa ($T_{1/2}$ relativa) como la semivida ($T_{1/2}$) del compuesto en cuestión, dividida por la semivida (t ½) de GLP-1 (7-37), determinada de igual manera.

Resultados

La semivida relativa de los compuestos conocidos liraglutida y semaglutida era 4,8 y 1,2, respectivamente.

Excepto para un compuesto, todos los derivados de GLP-1 de la invención que se testaron tenían una semivida relativa de al menos 1; 31 de ellos tenían una semivida relativa de al menos 2; y 10 tenían una semivida de al menos 5.

Ejemplo 58: Farmacocinética en la rata

El propósito de este ejemplo es investigar la semivida in vivo en la rata.

Se realizaron estudios farmacocinéticos in vivo en ratas con 10 derivados de GLP-1 (compuestos de los presentes Ejemplos 2, 4-5, 16-17, 25, 29, 36, 39 y 43) de la invención, como se describe a continuación. Se incluyó semaglutida para comparación. Se obtuvieron ratas macho Sprague Dawley de la misma edad con un peso corporal de 400 a 600 g de Taconic (Dinamarca) y se asignaron a los tratamientos por aleatorización simple en cuanto a peso corporal, aproximadamente 3-6 ratas por grupo, de tal modo que todos los animales de cada grupo tenían un peso corporal similar.

Los derivados de GLP-1 (aproximadamente 6 nmol/ml) se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0,05% Tween 80, pH 7,4. Se administraron inyecciones i.v. (1,0 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter implantado en la vena yugular derecha. Se tomaron muestras de sangre de la vena sublingual durante 5 días después de la dosificación. Se recogieron muestras de sangre (200 µL) en tampón de EDTA (8 mM) y se centrifugaron luego a 4ºC y 10.000 G durante 5 minutos. Las muestras de plasma se mantuvieron a -20ºC hasta su análisis para concentración en plasma del compuesto respectivo de GLP-1.

Las concentraciones en plasma de los compuestos GLP-1 se determinaron utilizando un Inmunoensayo de Luminiscencia por Canalización de Oxígeno (LOCI), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247. Las cuentas de donante se recubrieron con estreptavidina, mientras que las cuentas de aceptor se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconocía un epítopo medio-/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el término N, se biotiniló. Las tres sustancias reaccionantes se combinaron con el analito y formaron un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberaba átomos de oxígeno singulete procedentes de las cuentas de donantes, que se canalizaron a las cuentas de aceptor y desencadenaban quimioluminiscencia, que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz era proporcional a la concentración del compuesto.

Se analizaron perfiles concentración en plasma-tiempo utilizando WinNonlin (versión 5.0, Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.), y se calculó la semivida ($T_{1/2}$) utilizando perfiles individuales concentración en plasma-tiempo de cada animal.

Resultados

La semivida de semaglutida era 4 horas.

La totalidad de los 10 derivados de la invención que se testaron tenían una semivida de al menos 4 horas, todos ellos menos 1 tenían una semivida de al menos 8 horas, 7 tenían una semivida de al menos 12 horas, 6 tenían una semivida de al menos 16 horas, y 3 tenían una semivida de al menos 24 horas.

Si bien se han ilustrado y descrito en esta memoria ciertas características de la invención, pueden ser ideadas ahora muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes por aquéllos que tienen una experiencia ordinaria en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S
<120> Derivados de GLP-1 con doble acilación
<130> 8067.204-WO
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
< 211> 31
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens
<220>
< 221> PÉPTIDO
< 222> (1)...(31)
< 223> GLP-1(7-37)
<400> 1

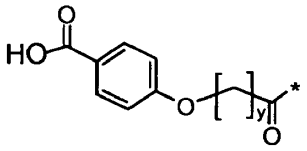
```
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

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

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de un análogo de GLP-1,
análogo que comprende un primer residuo k en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo k en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37), en el cual el primer residuo k se designa K^{37}, y el segundo residuo k se designa K^{26}, análogo que tiene un máximo de diez modificaciones de aminoácido comparado con GLP-1 (7-37), con inclusión de K^{37} y un Q o un R en una posición que corresponde a la posición 34 de GLP-1 (7-37);
derivado que comprende dos restos de fijación de albúmina unidos a K^{26} y K^{37}, respectivamente, en el que el resto de fijación de albúmina comprende un resto de prolongación de fórmula

Chem. 2a:



,

en la cual y es un número entero en el intervalo de 7-15;
o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El derivado de la reivindicación 1, en el cual el análogo tiene un máximo de cinco modificaciones de aminoácido.

3. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el cual el análogo comprende Imp^{7}, y/o Aib^{8}.

4. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual el análogo comprende Aib^{8}.

5. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el cual el análogo no comprende H^{31} y Q^{34}.

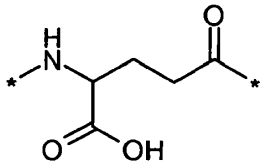
6. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el cual el análogo comprende las modificaciones de aminoácido siguientes, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1): 8Aib, 34R, 37K.

7. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el cual el análogo tiene las modificaciones de aminoácido siguientes, comparado con GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1): 8Aib, 34R, 37K.

8. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el cual y es 9.

9. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el cual el resto de fijación de albúmina comprende adicionalmente Chem.6 y/o Chem.5:

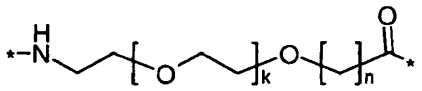
Chem. 6:



,

y/o

Chem. 5:



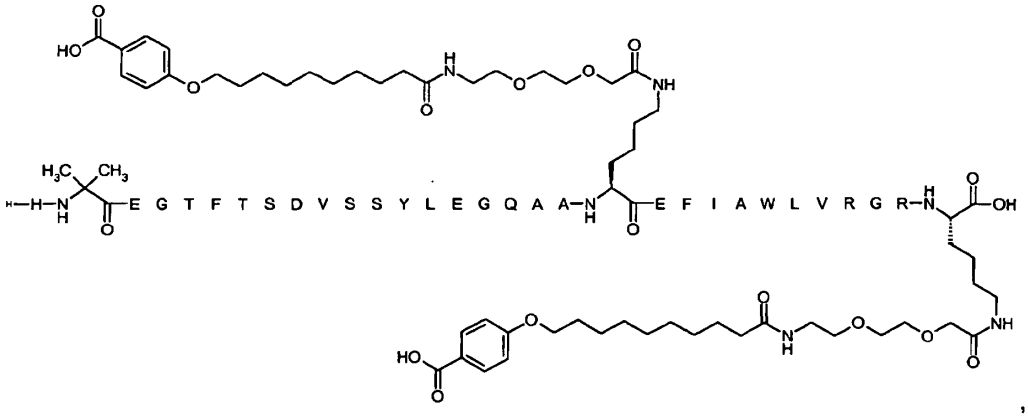
,

en el que k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

10. Un compuesto seleccionado de los siguientes:

$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-12-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi}etoxi)acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-{2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoil-amino]etoxi}etoxi)acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

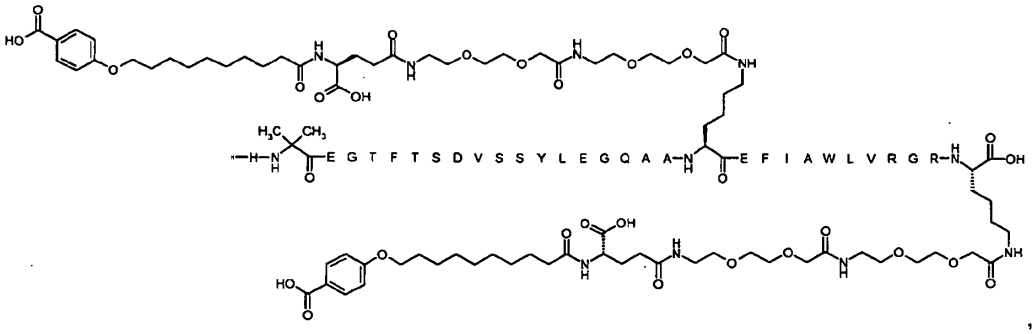
Chem. 20:



,

$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-(2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37),

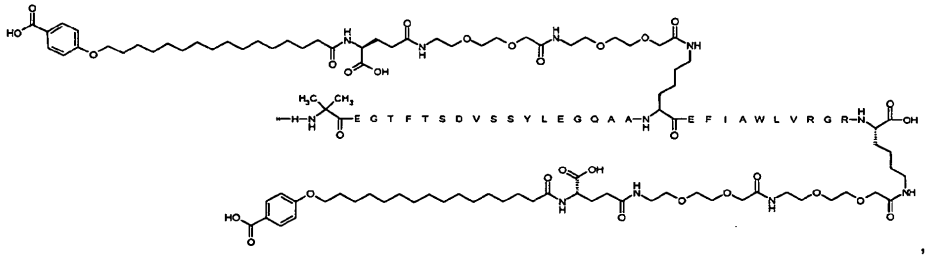
Chem. 21:



,

$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[16-(4-Carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[16-(4-carboxifenoxi)hexadecanoilamino]butirilamino}-etoxi)etoxi].acetilamino}etoxi)etoxi]acetil}-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37),

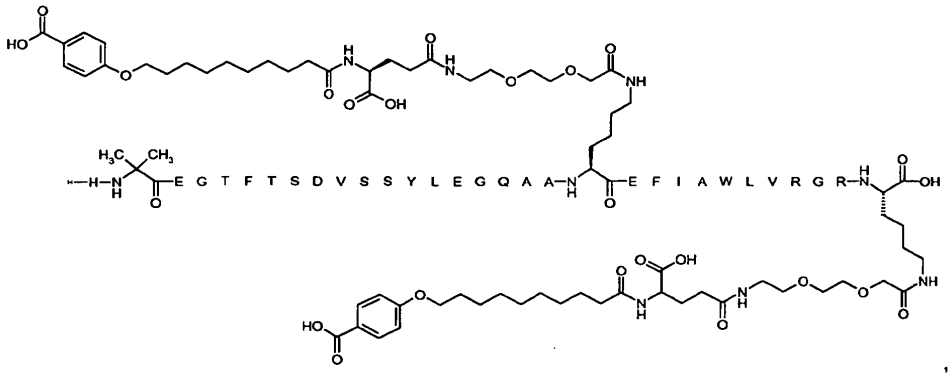
Chem. 32:



,

$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)-etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]-butirilamino}etoxi)etoxi]acetil}[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37)

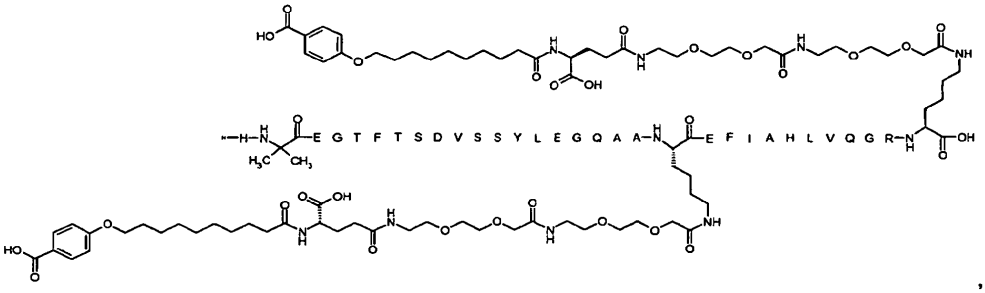
Chem. 34:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi)acetil]-$N^{\varepsilon 37}$-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]-etoxi)etoxi]acetilamino) etoxi]etoxi)acetil][Aib^{8},His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1 (7-37),

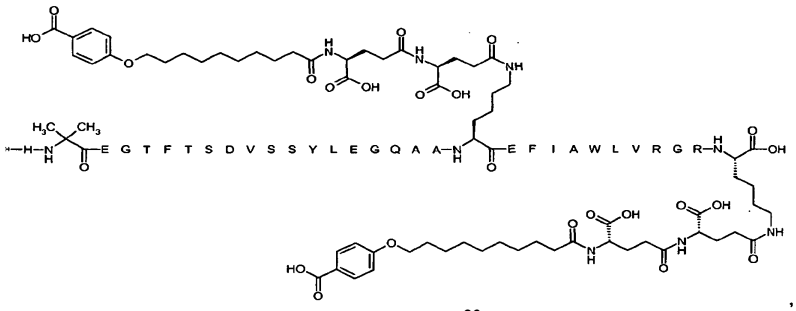
Chem. 36:



,

$N^{\varepsilon 26}$-((S)-4-Carboxi-4-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril), $N^{\varepsilon 37}$-((S)-4-Carboxi-4-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)-decanoilamino]butirilamino}butiril)[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1(7-37),

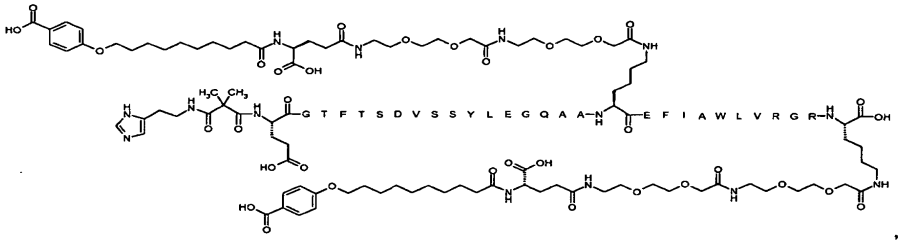
Chem. 38:



,

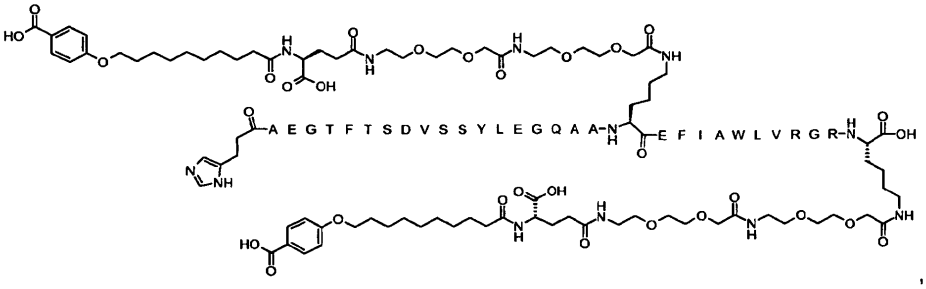
N^{9}-{2-[2-(1H-Imidazol-4-il)etilcarbamoil]-2-metilpropionil)-$N^{\varepsilon 26}$-{2-[2-(2-(2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo}, $N^{\varepsilon 37}$-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butirilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil} [Arg^{34}, Lys^{37}]-péptido GLP-1(9-37) ,

Chem. 42:



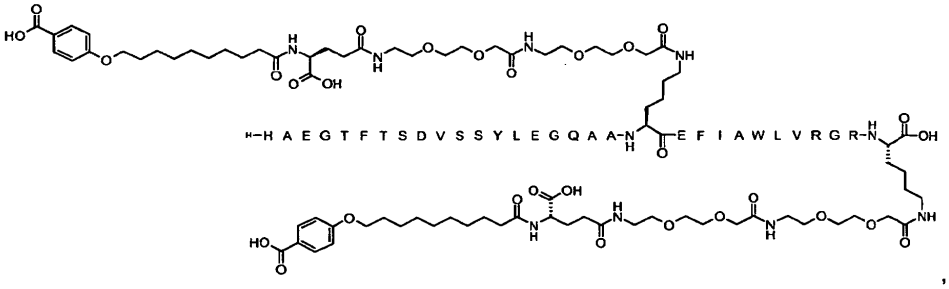
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi) decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo],$N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi) decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp^{7},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 47:



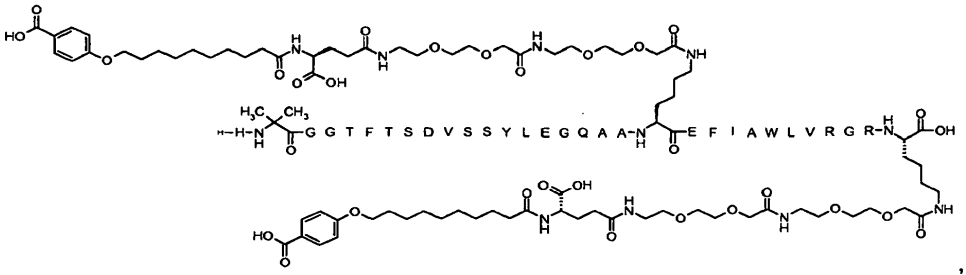
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-(2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 48:



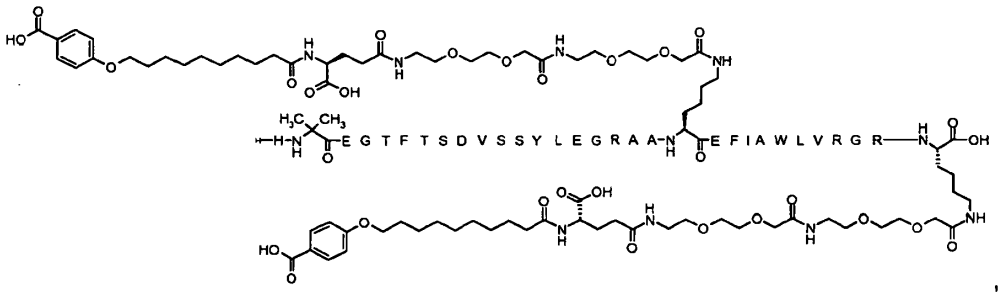
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Gly9,Arg34,Lys37]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 49:



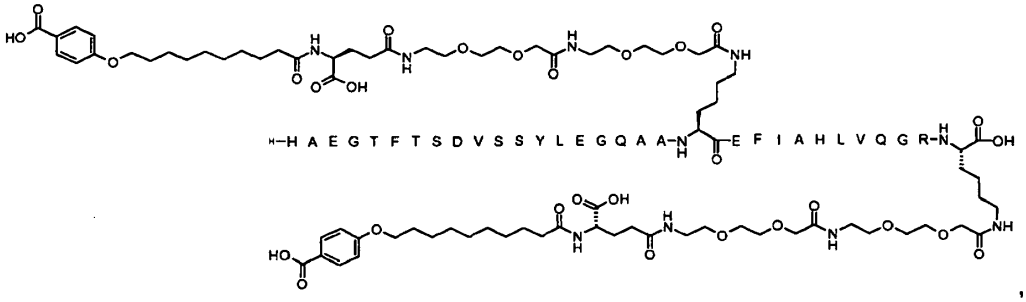
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{23},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 50:



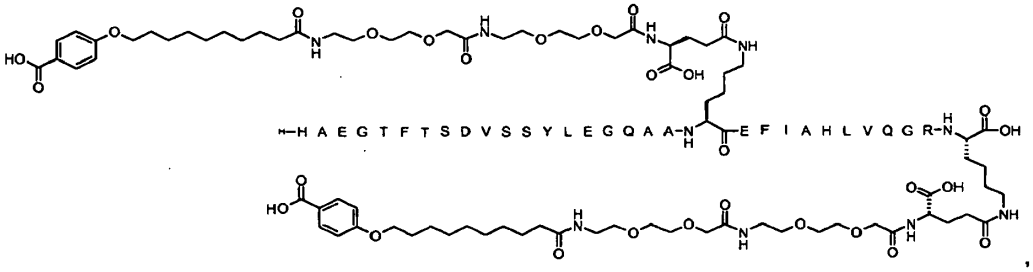
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 52:



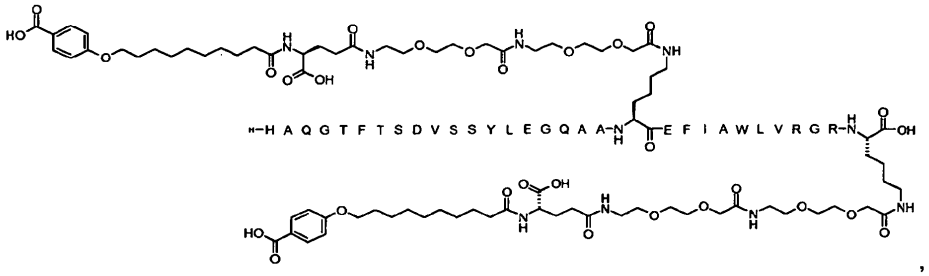
$N^{\varepsilon 26}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]butanoil], $N^{\varepsilon 37}$-[(4S)-4-Carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[His^{31},Gln^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 55:



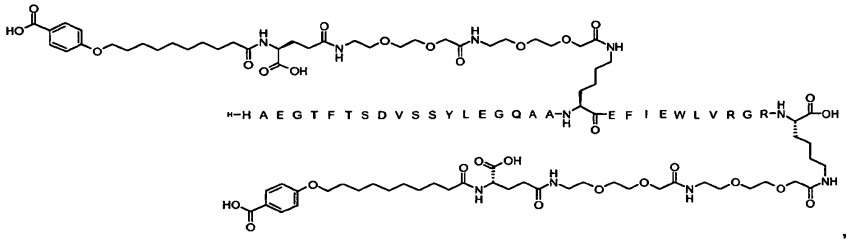
$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Gln^{9},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 56:



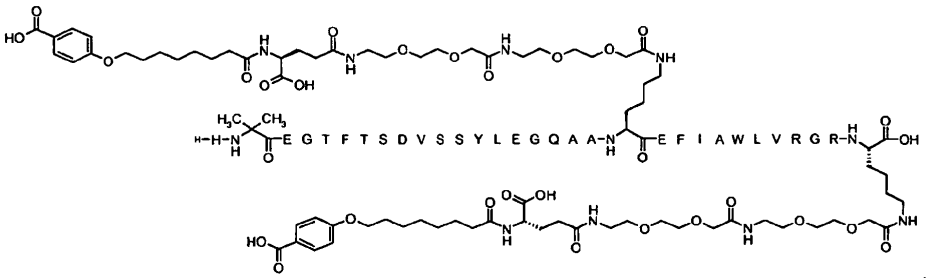
N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu^{30},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 57:



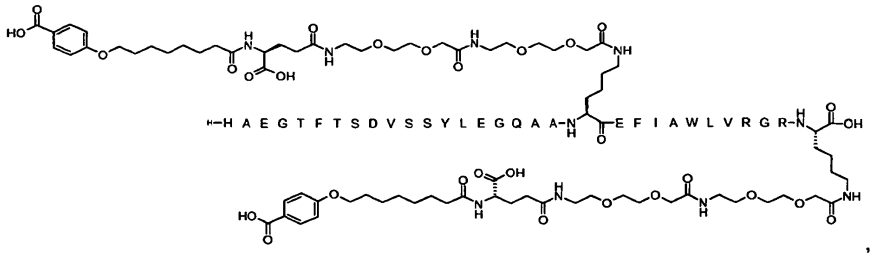
N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 58:



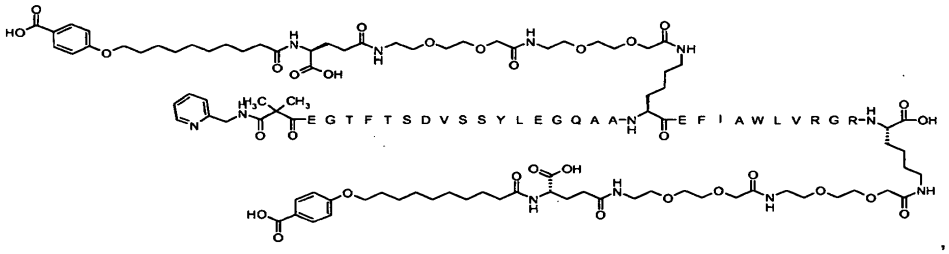
N$^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], N$^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

Chem. 59:



N{9}-[2,2-dimetil-3-oxo-3-(piridin-2-ilmetilamino)propanoil], $N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(9-37),

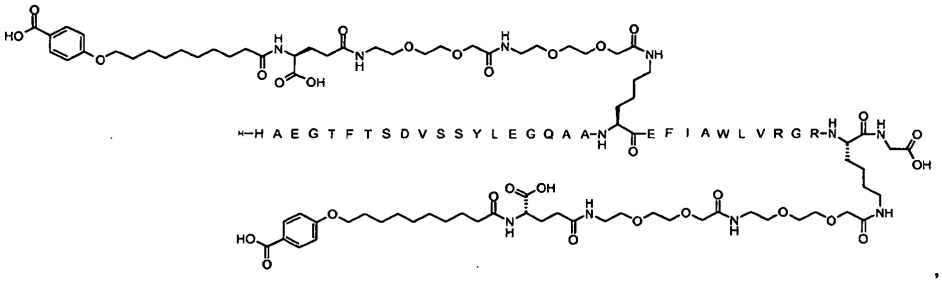
Chem. 60:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly,

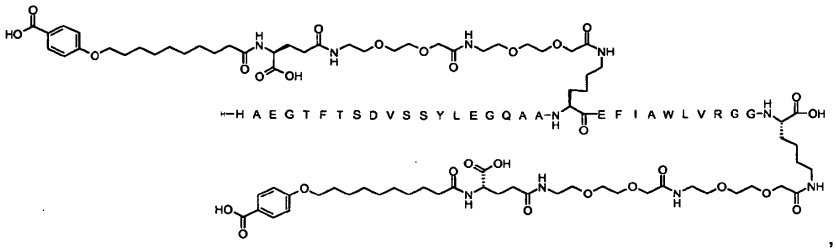
Chem. 61:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Gly^{36},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

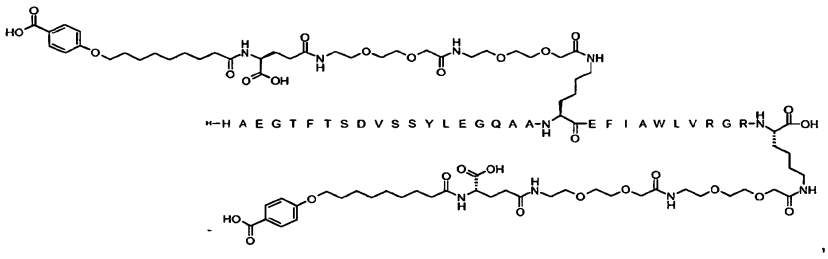
Chem. 62:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[9-(4-Carboxifenoxi)nonanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[9-(4-carboxifenoxi)nonanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

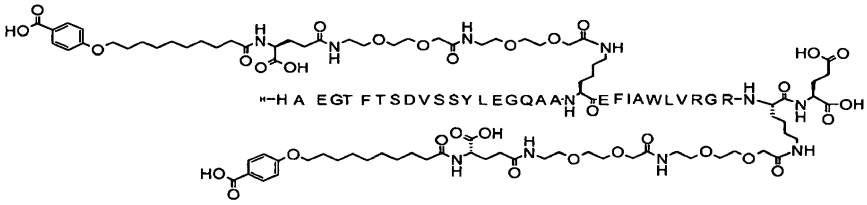
Chem. 63:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu,

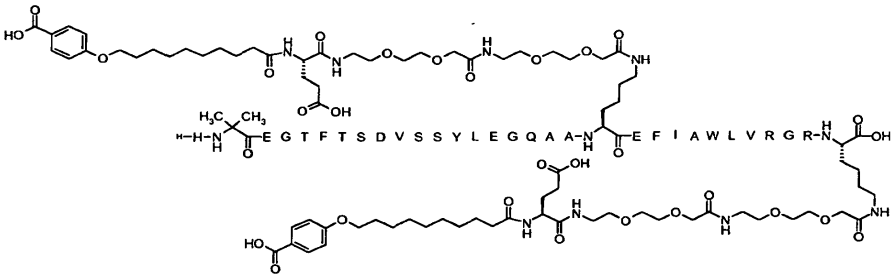
Chem. 65:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4-Carboxi-2-[10-(4-Carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(2S)-4-Carboxi-2-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib^{8},Arg^{34},Lys^{37}]-péptido GLP-1-(7-37),

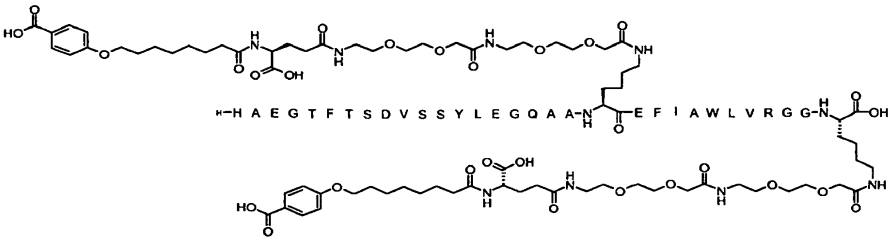
Chem. 67:



,

$N^{\varepsilon 26}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetilo], $N^{\varepsilon 37}$-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-Carboxi-4-[8-(4-carboxifenoxi)octanoilamino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg34,Gly36,Lys37]-péptido GLP-1-(7-37), y

Chem. 68:



;

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Un compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para uso como medicamento.

12. Un compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.

13. Uso de un compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades afines, tales como trastornos de la comida, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedad grave, y/o síndrome de ovario poliquístico; y/o para mejora de los parámetros de lípidos, mejora de la función de las células β, y/o para retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética.