

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 735**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/EP2013/059113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13723444 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2846824**

54 Título: **Derivados de GLP-1 doblemente acilados**

30 Prioridad:

08.05.2012 EP 12167093
14.05.2012 US 201261646469 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOFOED, JACOB y
GARIBAY, PATRICK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 629 735 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 doblemente acilados

Campo técnico

5 La presente se refiere a derivados de análogos del péptido análogo al glucagón tipo 1 (GLP-1), más en concreto a ciertos derivados doblemente acilados en K²⁶ y en K³⁴ del GLP-1 y a su uso farmacéutico.

Antecedentes

En *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 se divulgan derivados de GLP-1 (7-37) que están doblemente acilados en K^{26,34}.

El documento WO 99/43706 A1 divulga varios derivados mono- y doblemente acilados de GLP-1.

10 El documento WO 98/08871 A1 divulga varios derivados de GLP-1, incluidos algunos que están doblemente acilados.

El documento WO 2011/080103 A1 divulga varios derivados de GLP-1 que están doblemente acilados en K^{26,37}.

Compendio

15 Los derivados de GLP-1 de la invención están acilados en las lisinas naturales en las posiciones 26 y 34. Las cadenas laterales son restos de unión a álbum en que comprenden un resto de prolongación seleccionado entre ácidos grasos con un grupo carboxifenoxi distal que está acilado, mediante un conector específico, a un grupo de lisina del péptido GLP-1, preferentemente en el grupo épsilon-amino de este.

20 El péptido GLP-1 puede ser GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) o un análogo de este que tiene en total hasta ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1 (7-37). Los cambios son, de manera independiente, una o más adiciones, una o más deleciones y/o una o más sustituciones.

25 Más en concreto, la invención se refiere a un derivado de un péptido GLP-1, donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y como máximo ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1 (7-37), donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, cada uno mediante un conector, donde el resto de prolongación es Quím. 2: HOOC-C₆H₄-O-(CH₂)_y-CO-*, en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y cada conector comprende Quím. 3a: *-NH-(CH₂)_q-CH[(CH₂)_w-NR₁R₂]-CO-*, donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R₁ y R₂ representan de manera independiente un radical de hidrógeno (*-H) o metilo (*-CH₃) y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

30 La invención también se refiere al uso de un derivado de este tipo como un medicamento, en particular al uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.

35 También se divulgan productos intermedios en forma de análogos de GLP-1 novedosos, que son relevantes para preparar ciertos derivados de la invención.

También se divulga un compuesto intermedio en forma de un compuesto protegido novedoso (Quím. 39, Ejemplo 19) que se puede utilizar en la síntesis del compuesto del Ejemplo 13 de la presente y compuestos similares.

40 Los derivados de la invención son activos desde un punto de vista biológico. También, o como alternativa, pueden tener un perfil farmacocinético prolongado. También, o como alternativa, tienen una biodisponibilidad oral elevada. Estas propiedades son importantes para desarrollar la siguiente generación de compuestos de tipo GLP-1 para la administración subcutánea, intravenosa y/o, en particular, oral.

La liraglutida es un derivado monoacilado de GLP-1 para administrar una vez al día y comercializado desde 2009 por Novo Nordisk A/S. Éste compuesto se divulga en el documento WO 98/08871 A1 (Ejemplo 37).

45 El documento WO 06/097537 A2 divulga entre otros derivados de GLP-1 la semaglutida (Ejemplo 4), que es un derivado monoacilado de GLP-1 para administrar una vez a la semana y que está desarrollando Novo Nordisk A/S.

Descripción

50 En las siguientes secciones, las letras griegas se pueden representar por su símbolo o por el correspondiente nombre escrito, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc. Asimismo, la letra griega μ puede estar representada por "u", por ejemplo, en μL=uL, o en μM=uM.

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

En un primer aspecto, la invención se refiere a un derivado de un péptido GLP-1, donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y como máximo

5 ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1 (7-37), donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, donde el resto de prolongación es Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y el conector comprende



donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R₁ y R₂ representan de manera independiente un radical de hidrógeno *-H o *-CH₃ y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

Péptidos y análogos de GLP-1

15 La expresión «péptido GLP-1», tal como se utiliza en la presente, se refiere al péptido análogo al glucagón tipo 1 (GLP-1 (7-37)), cuya secuencia se incluye en la lista de secuencias como la SEQ ID NO:1 o un análogo de esta. El péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1 también se puede denominar GLP-1 «natural».

La expresión «análogo de GLP-1», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un péptido o a un compuesto que es una variante de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

20 En la lista de secuencias, al primer residuo aminoacídico de la SEQ ID NO:1 (histidina) se le asigna el n.º 1. Sin embargo, según lo que es habitual en la técnica, se hace referencia a este residuo de histidina como n.º 7 y los residuos aminoacídicos posteriores se enumeran en consecuencia y se acaba con la glicina n.º 37. Por lo tanto, por lo general, cualquier referencia en la presente a un número de un residuo aminoacídico o un número de la posición de la secuencia de GLP-1 (7-37) es respecto a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y acaba con Gly en la posición 37.

Los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención se pueden describir haciendo referencia i) al número del residuo aminoacídico en el GLP-1 (7-37) natural que corresponde al residuo aminoacídico que se cambia (es decir, la posición correspondiente en el GLP-1 natural) y ii) al propio cambio.

30 El análogo de GLP-1 que forma parte del derivado de la invención comprende como máximo ocho cambios de aminoácidos cuando se compara con el GLP-1 (7-37) natural (SEQ ID NO:1). En otras palabras, es un péptido de GLP-1 (7-37) en el que se han cambiado varios residuos aminoacídicos en comparación con el GLP-1 (7-37) natural (SEQ ID NO:1). Estos cambios pueden representar, de manera independiente, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura de análogos apropiada.

35 Por ejemplo, el análogo [Imp⁷, Aib⁸]-GLP-1-(7-37) se refiere al péptido de GLP-1 (7-37) que tiene, cuando se compara con el GLP-1 natural, las siguientes sustituciones: La sustitución de la histidina en la posición 7 con imidazopropionilo (que también se puede denominar desaminohistidina (desH)) y la sustitución de la alanina en la posición 8 con Aib (ácido α-aminoisobutírico). Este análogo también se puede denominar de manera resumida (7Imp, 8Aib), donde se hace referencia a GLP-1 (7-37).

40 Los análogos «que comprenden» ciertos cambios especificados pueden comprender cambios adicionales cuando se comparan con la SEQ ID NO:1.

Como es evidente de los ejemplos anteriores, los residuos aminoacídicos se pueden identificar por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son totalmente equivalentes.

45 Las expresiones «una posición equivalente a» o la «posición correspondiente» se pueden utilizar para caracterizar el sitio de cambio en una secuencia variante de GLP-1 (7-37) haciendo referencia al GLP-1 (7-37) natural (SEQ ID NO:1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como también el número de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo, simplemente mediante la escritura y con una inspección a ojo; y/o se puede utilizar un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar, tal como «align» que es una alineación de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453 y Myers and W. Miller describen el programa «align» en «Optimal Alignments in Linear Space» CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17. Para la alineación, se pueden utilizar la matriz de calificación por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad por defecto, y la penalización por el primer residuo en un

hueco se puede fijar en -12 o, preferentemente, a -10 y las penalizaciones por residuos adicionales en un hueco a -2 o, preferentemente, a -0.5.

Un ejemplo de tal alineación se inserta a continuación en la presente, en el cual la secuencia n.º 1 (SEQ_ID_NO_1) es la SEQ ID NO:1, y la secuencia n.º 2 (ANÁLOGO) es su análogo (8Aib, 22E, 30E).

- 5 # Secuencias alineadas: 2
 - # 1: SEQ_ID_NO_1 1
 - # 2: ANÁLOGO
 - # Matriz: EBLOSUM62
 - # Penalización por el hueco: 10.0
- 10 # Penalización_extensión: 0.5
 - # Longitud: 31
 - # Identidad: 28/31 (90.3%)
 - # Similitud: 28/31 (90.3%)
 - # Huecos: 0/31 (0.0%)
- 15 # Calificación: 145.0

SEQ_ID_NO_1	
ANÁLOGO	1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG 31 . . . 1 HXEGTFTEDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG 31

Como se puede deducir de la alineación anterior, en el caso de que se incluyan en la secuencia aminoácidos no naturales tales como Aib, a efectos de la alineación estos se pueden reemplazar con X. Si se desea, X se puede corregir posteriormente a mano.

20 El término «péptido» como se utiliza, por ejemplo, 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 mediante enlaces de tipo amida (o peptídicos).

25 Los péptidos de la invención comprenden al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados mediante enlaces peptídicos. En las realizaciones particulares, el péptido comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 20, aún más preferentemente al menos 25 o de la manera más preferida al menos 28 aminoácidos.

En las realizaciones particulares, el péptido está compuesto por al menos cinco aminoácidos constituyentes, preferentemente compuesto por al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o de la manera más preferida compuesto por al menos 28 aminoácidos.

30 En las realizaciones particulares adicionales, el péptido está a) compuesto por o b) constituido por i) 28, ii) 29, iii) 30, iv) 31, v) 32 o vi) 33 aminoácidos.

En una realización aún más particular, el péptido está constituido por aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico y, de manera opcional, uno o más grupos adicionales, a menudo denominados cadena lateral.

35 El término «aminoácido» incluye los aminoácidos proteinógenos (codificados por el código genético, incluidos los aminoácidos naturales y los aminoácidos estándar), así como también los no proteinógenos (que no se encuentran en las proteínas y/o no están codificados por el código genético estándar) y los aminoácidos sintéticos. Por lo tanto, los aminoácidos se pueden seleccionar a partir del grupo de aminoácidos proteinógenos, aminoácidos no proteinógenos y/o aminoácidos sintéticos.

Los ejemplos no limitantes de aminoácidos que no están codificados por el código genético son el gamma-carboxiglutamato, ornitina y fosfoserina. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos sintéticos son los isómeros D de los aminoácidos tales como la D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), β -alanina y desaminohistidina (desH, nombre alternativo del ácido imidazopropiónico, abreviado Imp).

- 5 En lo que sigue, se debe sobreentender que todos los aminoácidos específicos para los cuales no se precise el isómero óptico se refieren al isómero L (a menos que se especifique lo contrario), por ejemplo, cuando se hace referencia al aminoácido específico de la glutamina, se pretende hacer referencia a la L-glutamina, a menos que se afirme lo contrario. Por otra parte, cuando los aminoácidos se describen con fórmulas más generales tales como fórmulas empíricas o fórmulas estructurales y cuando no se muestre la estereoquímica, se pretende que estas fórmulas engloben todos los estereoisómeros.

- 10 Los derivados y análogos de GLP-1 de la invención tienen actividad GLP-1. Este término se refiere a la capacidad de unirse al receptor de GLP-1 e iniciar una ruta de transducción de señales que resulte en una acción insulínica u otros efectos fisiológicos tal como se sabe en la técnica. Por ejemplo, los análogos y derivados de la invención se pueden estudiar para determinar su actividad GLP-1 utilizando uno o más de los ensayos descritos en los Ejemplos 20-21 de la presente. El ensayo de unión al receptor de GLP-1 descrito en el Ejemplo 22 también se puede utilizar, si es relevante, como una medida de la actividad GLP-1 o, de manera más precisa, la afinidad por el receptor de GLP-1 (el experimento con poca HSA).

Derivados de GLP-1

- 20 El término «derivado», tal como se utiliza en la presente en el contexto de un péptido o un análogo de GLP-1, se refiere a un péptido o análogo de GLP-1 modificado químicamente en el cual se han unido de manera covalente uno o más sustituyentes al péptido. El sustituyente también se puede denominar cadena lateral.

- 25 En una realización particular, la cadena lateral es capaz de formar agregados no covalentes con la albúmina y promover de esta manera la circulación del derivado con el torrente sanguíneo y también posee el efecto de prolongar el tiempo de acción del derivado, debido a que el agregado del derivado de GLP-1 y la albúmina únicamente se desintegra de manera lenta para liberar el ingrediente farmacéutico. Así pues, el sustituyente o cadena lateral, como un todo, se denomina preferentemente resto de unión a la albúmina.

- 30 En otra realización particular, el resto de unión a la albúmina comprende una porción que es especialmente relevante para la unión a la albúmina y, por lo tanto, la prolongación, donde la porción se puede denominar en consecuencia un resto de prolongación. El resto de prolongación puede estar en el extremo o cerca del extremo opuesto del resto de unión a la albúmina, respecto a su punto de unión al péptido.

- En una realización aún más particular, el resto de unión a la albúmina comprende una porción entre el resto de prolongación y el punto de unión al péptido, donde la porción se puede denominar un conector, resto conector, espaciador o similares. El conector puede ser opcional y, así pues, en ese caso el resto de unión a la albúmina puede ser idéntico al resto de prolongación.

- 35 En realizaciones particulares, el resto de unión a la albúmina y/o el resto de prolongación es lipófilo y/o tiene carga negativa a pH fisiológico (7.4).

El resto de unión a la albúmina, el resto de prolongación o el conector puede estar unido de manera covalente a un residuo de lisina del péptido GLP-1 por acilación.

- 40 En una realización preferida, un éster activo del resto de unión a la albúmina, que comprende preferentemente un resto de prolongación y un conector, se une de manera covalente a un grupo amino de un residuo de lisina, de manera preferente un grupo épsilon-amino de este, al formarse un enlace amida (este proceso se denomina acilación).

A menos que se indique lo contrario, cuando se hace referencia a una acilación de un residuo de lisina, se sobreentiende que es un grupo épsilon-amino de este.

- 45 Un derivado que comprende dos restos de prolongación unidos a un primer y un segundo residuo de K (es decir, a K²⁶ y K³⁴) mediante un conector se puede decir que es un derivado que se ha acilado dos veces, doblemente acilado o con una acilación dual en los grupos épsilon-amino del primer y segundo residuos de lisina, por ejemplo, en la posición 26 y 34, respectivamente, del péptido GLP-1.

- 50 A efectos de la presente, las expresiones «resto de unión a albúmina», «resto de prolongación» y «conector» pueden incluir tanto las formas que han reaccionado como las que no han reaccionado de estas moléculas. Si se hace referencia a una forma o a la otra queda claro a partir del contexto en el que se utiliza la expresión.

En un aspecto, cada resto de prolongación comprende o está constituido por un resto de prolongación seleccionado de manera independiente entre Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13.

En una realización, $^{*-(CH_2)_y-}$ se refiere a un alquileo lineal en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13.

La expresión «ácido graso» se refiere a ácidos monocarboxílicos alifáticos que tienen de 4 a 28 átomos de carbono, preferentemente no está ramificado y/o incluso no numerado y puede ser saturado o insaturado.

5 La nomenclatura es la habitual en la técnica, por ejemplo, en las fórmulas anteriores, $^{*-COOH}$ así también como $HOOC-^*$ se refiere a carboxi; $^{*-C_6H_4-^*}$ a fenileno; $^{*-CO-^*}$, así también como $^{*-OC-^*}$, a carbonilo ($O=C-^*$); $C_6H_5-O-^*$ a fenoxi. Además, $CO-^*$ se refiere a $C(=O)-^*$. Por ejemplo, en cualquier fórmula ($R-CO-^*$) de la presente (donde R es tal como se ha definido para cada fórmula), $R-CO-^*$ se refiere a $R-C(=O)-^*$. En realizaciones particulares, los radicales aromáticos, tales como el fenoxi y el fenileno, pueden estar en *para*.

10 Tal como se ha explicado anteriormente, los derivados de GLP-1 de la presente invención, están doblemente acilados, es decir, dos restos de unión a la albúmina están unidos de manera covalente al péptido GLP-1.

En una realización particular, los dos restos de unión a la albúmina (es decir, la totalidad de las cadenas laterales) son similares, de manera preferente sustancialmente idénticos o, de la manera más preferida, idénticos.

15 En otra realización particular, los dos restos de prolongación son similares, de manera preferente sustancialmente idénticos o, de la manera más preferida, idénticos.

En una realización aún más particular, los dos conectores son similares, de manera preferente sustancialmente idénticos o, de la manera más preferida, idénticos.

20 La expresión «sustancialmente idénticos» incluye las diferencias de la identidad que son debidas a la formación de una o más sales, ésteres y/o amidas; preferentemente la formación de una o más sales, ésteres de metilo y amidas simples; más preferentemente la formación de no más de dos sales, ésteres de metilo y/o amidas simples; aún más preferentemente la formación de no más de una sal, éster de metilo y/o amida simple; o de la manera más preferida, la formación de no más de una sal.

25 En el contexto de los compuestos químicos tales como los restos de unión a la albúmina, los restos de prolongación y conectores, se puede determinar la similitud y/o identidad utilizando cualquier programa informático y/o algoritmo adecuado conocido en la técnica.

Por ejemplo, la similitud de dos restos de prolongación, dos conectores y/o dos cadenas laterales enteras se puede determinar de manera conveniente utilizando las huellas moleculares. La huella es un método matemático de representación de una estructura química (remítase, por ejemplo, a *Chemoinformatics: A textbook*, Johann Gasteiger y Thomas Engel (Eds), Wiley-VCH Verlag, 2003).

30 Los ejemplos de huellas adecuadas incluyen, sin carácter limitante, las huellas UNITY, huellas MDL y/o huellas ECFP, tales como huellas ECFP_6 (ECFP significa huellas de conectividad extendida).

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

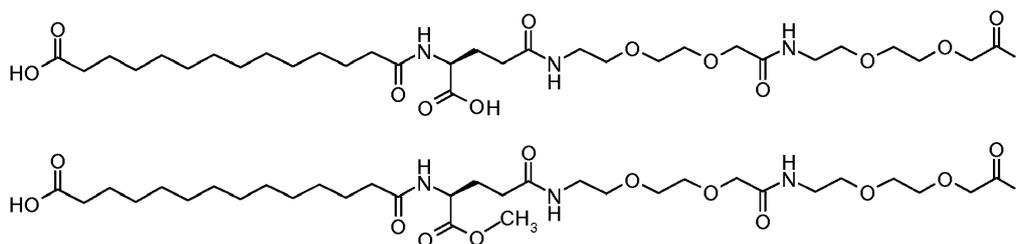
35 Preferentemente, se utiliza el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud de dos huellas, sin importar que se utilice a), b) o c).

40 En realizaciones particulares, sin importar que se utilice a), b) o c), los dos restos de prolongación, los dos conectores y/o las dos cadenas laterales enteras tienen, respectivamente, una similitud de al menos 0.5 (50%); preferentemente de al menos 0.6 (60%); más preferentemente de al menos 0.7 (70%), o de al menos 0.8 (80%); aún más preferentemente de al menos 0.9 (90%); o de la manera más preferida de al menos 0.99 (99%), tal como una similitud de 1.0 (100%).

Se pueden calcular las huellas UNITY utilizando el programa SYBYL (se puede adquirir de Tripos, 1699 South Hanley Road, San Luis, MO 63144-2319 EE. UU). Se pueden calcular las huellas ECFP_6 y MDL utilizando el programa Pipeline Pilot (se puede adquirir de Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, EE. UU.).

45 Para consultar más detalles remítase, por ejemplo, a *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 también SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic Chemistry User Guide, marzo de 2008, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008 - ambos de Accelrys Software Inc., San Diego, EE. UU., y las directrices http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf y http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf.

50 Un ejemplo de un cálculo similar se inserta a continuación en la presente, donde se compara una cadena lateral entera conocida de un derivado de GLP-1 conocido con uno de sus ésteres de metilo:



Utilizando a) las huellas ECFP_6 la similitud es 0.798, utilizando b) las huellas UNITY la similitud es 0.957; y utilizando las huellas MDL la similitud es 0.905

- 5 En caso de dos cadenas laterales idénticas (restos de unión a la albúmina) el derivado se puede denominar simétrico.

En realizaciones particulares, el coeficiente de similitud es de al menos 0.80, preferentemente al menos 0.85, más preferentemente al menos 0.90, aún más preferentemente al menos 0.95 o de la manera más preferida al menos 0.99.

- 10 Cada uno de los dos conectores del derivado de la invención comprende el siguiente primer elemento conector (A): Quím. 3a: $^*\text{-NH}-(\text{CH}_2)_q\text{-CH}[(\text{CH}_2)_w\text{-NR}_1\text{R}_2]\text{-CO}^*$, donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R₁ y R₂ representan de manera independiente un $^*\text{-H}$ (un radical de hidrógeno) o $^*\text{-CH}_3$ (metilo) y w es un número entero en el intervalo de 0-5.

- 15 Un ejemplo no limitante de un conector que comprende el primer elemento conector de Quím. 3a es la lisina o más bien, un di-radical de lisina. La lisina se puede utilizar de manera preferente como un conector en su versión omega, donde omega se refiere al hecho de que es el grupo amino en el átomo de C distal de la cadena sustituyente de alquilo el que se transforma en el radical (en $^*\text{-NH}$). Por lo general, en la presente la posición omega de la lisina se denomina la posición épsilon (el átomo alfa es el átomo de C adyacente a la función de tipo ácido carboxílico, y cada átomo de C anterior se designa entonces utilizando las letras griegas siguientes beta, gamma, delta y así sucesivamente, hasta que se alcanza el átomo de C al que está unido el grupo $^*\text{-NH}$ y es en el caso de la lisina el átomo épsilon. En consecuencia, cuando w = 0, R₁ y R₂ representan ambos $^*\text{-H}$, y q = 4, la fórmula Quím. 3a se refiere a un di-radical de épsilon-lisina (eps-Lys; Quím. 6).

- 25 Otro ejemplo no limitante de un conector que comprende este primer elemento conector de Quím. 3a es la *N*^α,*N*^α-dimetilisina, o más bien un di-radical de este residuo (6-amino-(S)-2-(dimetilamino)hexanoilo). Asimismo, la *N*^α,*N*^α-dimetilisina se puede utilizar de manera preferente como un conector en su versión omega, donde omega se refiere al hecho de que es el grupo amino en el átomo de C distal de la cadena sustituyente de alquilo el que se transforma en el radical (en $^*\text{-NH}$). Asimismo, por lo general, en la presente la posición omega de la *N*^α,*N*^α-dimetilisina se denomina la posición épsilon (el átomo alfa es el átomo de C adyacente a la función de tipo ácido carboxílico, y cada átomo de C anterior se designa entonces utilizando las letras griegas siguientes beta, gamma, delta y así sucesivamente, hasta que se alcanza el átomo de C al que está unido el grupo $^*\text{-NH}$ y es en el caso de la *N*,*N*-dimetilisina el átomo épsilon. En consecuencia, cuando w = 0, R₁ y R₂ representan ambos $^*\text{-CH}_3$, y q = 4, la fórmula Quím. 3a se refiere a un di-radical de *N*^α,*N*^α-dimetil-épsilon-lisina (de manera resumida «N,N-dimetil-eps-Lys»; Quím. 6a).

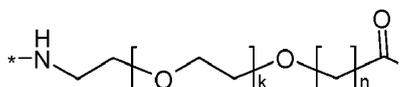
En una realización preferida, el primer elemento conector está en su forma L.

- 35 El conector puede comprender una o dos veces Quím. 3a). Cuando z es 2, los elementos Quím. 3a están interconectados preferentemente mediante un enlace de tipo amida. Por ejemplo, el conector puede comprender dos veces épsilon-Lys (2xeps-Lys; 2xQuím. 6).

- 40 El conector (cada uno del primer y segundo conector) puede adicionalmente (es decir, además de una o dos veces el primer elemento conector (A)) comprender uno o más elementos conectores adicionales, por ejemplo, elementos conectores seleccionados de manera independiente entre el segundo (B) y/o tercer (C) elementos conectores, tal como se definen a continuación:

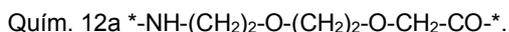
Un segundo elemento conector (B):

Quím. 12:



- 45 donde k es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

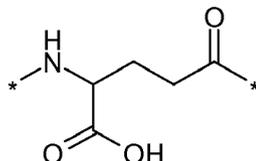
En una realización particular, cuando $k = 1$ y $n = 1$, este elemento conector se puede denominar OEG o ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico y/o puede estar representado por la siguiente fórmula:



Un tercer elemento conector (C), ácido gamma-glutámico (gGlu):

5

Quím. 14:



En el gamma-Glu (gGlu) es el grupo gamma-carboxi del aminoácido ácido glutámico el que se utiliza aquí para la conexión a otro elemento conector, o el grupo épsilon-amino de la lisina.

10 En una realización particular no limitante, cada conector está constituido por Quím. 14 y dos veces Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo $^*\text{-NH}$ al extremo CO-^* del resto de prolongación y en su extremo CO-^* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.

15 Por ejemplo, el primer conector está constituido por (Quím.14-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo $^*\text{-NH}$ al extremo CO-^* del primer resto de prolongación y en su extremo CO-^* al grupo épsilon-amino del primer residuo de K del análogo de GLP-1; y el segundo conector está constituido por (Quím.14-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo $^*\text{-NH}$ al extremo CO-^* del segundo resto de prolongación y en su extremo CO-^* al grupo épsilon-amino del segundo residuo de K del análogo de GLP-1.

20 Obviamente, tan sólo para mantener un buen orden: Aquí y en adelante, la frase «en la secuencia indicada» significa que el extremo $^*\text{-NH}$ del primer elemento conector mencionado (aquí Quím. 14) está conectado al extremo CO-^* del elemento prolongador y el extremo CO-^* del último elemento conector mencionado (aquí la última de las dos repeticiones de Quím. 6) está conectado al grupo épsilon-amino del residuo de K en cuestión del análogo de GLP-1.

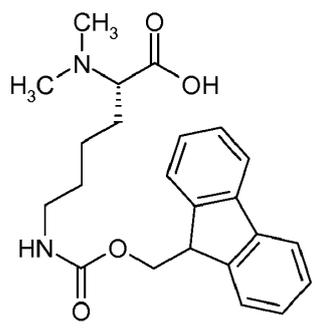
25 Los derivados de la invención pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas que tienen la misma fórmula molecular y secuencia de átomos unidos, pero que difieren únicamente en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. El estereoisomerismo de los derivados de la invención ejemplificados se indica en la sección experimental, tanto en los nombres como en las estructuras, utilizando la nomenclatura habitual. A menos que se indique lo contrario, la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas del derivado reivindicado.

30 La concentración en plasma de los derivados de GLP-1 de la invención se puede determinar utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede utilizar LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopia de masas) o inmunoensayos tales como RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática) y LOCI (inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente). Se pueden consultar protocolos generales para los ensayos adecuados de RIA y ELISA en, por ejemplo, las págs. 116-118 del documento WO09/030738. Un ensayo preferido es el ensayo LOCI, por ejemplo, descrito en el Ejemplo 24 de la presente.

Productos intermedios

35 También se divulga un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 seleccionado entre los siguientes análogos de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1): (i) 8Aib; (ii) 7Imp, 8Aib; (iii) 8Aib, 22E; o (iv) 8Aib, 22E, 30E; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los análogos de (i), (ii), (iii) o (iv).

40 También se divulga un producto intermedio en forma de un compuesto conector protegido novedoso que se puede utilizar en la síntesis del compuesto del Ejemplo 13 de la presente y compuestos similares, concretamente el compuesto ácido (S)-2-dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxicarbonilamino)hexanoico, con la estructura de Quím. 39:



o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

Éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable

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

Las sales se forman, por ejemplo, mediante una reacción química entre una base y un ácido, por ejemplo: $2 \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La sal puede ser una sal básica, una sal ácida o puede que no sea ninguno de estos casos (es decir, una sal neutra). En agua, las sales básicas producen iones de hidróxido y las sales ácidas iones de hidronio.

10 Las sales de los derivados de la invención se pueden formar añadiendo cationes o aniones que reaccionan con los 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.

15 Los ejemplos no limitantes de grupos aniónicos de los derivados de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en la cadena lateral, en caso de que los haya, así como también en el resto peptídico. El resto peptídico a menudo incluye un grupo de ácido carboxílico libre en el extremo C y también puede incluir grupos carboxílicos libres en residuos aminoácídicos internos tales como Asp y Glu.

Los ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en el resto peptídico incluyen el grupo amino libre en el extremo N, si está presente, así como también cualquier grupo amino libre de los residuos aminoácídicos básicos internos tales como His, Arg y Lys.

20 El éster de los derivados de la invención se puede formar, por ejemplo, mediante la reacción de un grupo de ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que da lugar al reemplazo de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi.

El grupo carboxílico libre en el extremo C del péptido y/o cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral puede participar en la formación del éster.

25 La amida de los derivados de la invención se puede formar, por ejemplo, mediante la reacción de una forma activada de un grupo de ácido carboxílico libre con una amina o una amina sustituida, o mediante la reacción de un grupo amino libre o sustituido con una forma activada de un ácido carboxílico.

30 En la formación de la amida puede participar el grupo carboxílico libre en el extremo C del péptido, cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral, el grupo amino libre en el extremo 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 el derivado está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización particular, el derivado está en forma de una amida farmacéuticamente aceptable, preferentemente con un grupo amida en el extremo C del péptido. En una realización aún más particular, el péptido o el derivado está en forma de un éster farmacéuticamente aceptable.

35 Propiedades funcionales

En un primer aspecto, los derivados de la invención tienen una buena potencia. También, o como alternativa, en un segundo aspecto pueden tener un perfil farmacocinético prolongado. También, o como alternativa, en un tercer aspecto tienen una biodisponibilidad oral elevada. También, o como alternativa, el número de mutaciones en el péptido GLP-1 (análogo de GLP-1) es bajo.

40 Actividad biológica (potencia)

De acuerdo con el primer aspecto, los derivados de la invención, así como también los péptidos GLP-1 constituyentes como tales, son potentes o activos desde un punto de vista biológico. De hecho, los derivados de la invención tienen una potencia sorprendentemente buena.

5 Más en particular, se ha demostrado que el elemento conector Quím. 3a, de manera sorprendente e inesperada, es superior cuando se compara con los elementos conectores conocidos en lo que se refiere a la potencia o actividad biológica del producto final resultante, el derivado de GLP-1.

10 Por ejemplo, cuando se utiliza un conector constituido por (Quím. 14-2xQuím.6) o (Quím.14-2xQuím.6a), en lugar del conector "gGlu-2xOEG" (Quím. 14-2xQuím. 13), que está consolidado en la técnica y tiene una reputación muy buena, los derivados de GLP-1 resultantes de la presente invención son, de manera sorprendente e inesperada, mucho más potentes en comparación con estos derivados de GLP-1 de vanguardia que son los mejores en su clase.

De manera sorprendente e inesperada, esto parece que es aún más pronunciado cuando el prolongador es del tipo Quím. 2, en comparación con otros prolongadores de vanguardia y establecidos tales como los ácidos alfa-omega-dicarboxílicos.

15 En una realización particular, la potencia y/o actividad se refiere a la potencia *in vitro*, es decir, el rendimiento en un ensayo del receptor de GLP-1 funcional, más en concreto a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.

La potencia *in vitro* se puede determinar, por ejemplo, en un medio que contiene membranas que expresan el receptor de GLP-1 humano y/o en un ensayo con células enteras que expresan el receptor de GLP-1 humano.

20 Por ejemplo, las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable que expresan el receptor de GLP-1 se pueden estimular con el análogo o derivado de GLP-1 en cuestión y medir la potencia de la producción de cAMP, por ejemplo, en función de la competencia entre el cAMP formado de manera endógena y el cAMP marcado con biotina añadido de manera exógena, que se puede capturar utilizando un anticuerpo específico, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 20.

25 Asimismo, o como alternativa, la respuesta del receptor de GLP-1 humano se puede medir en un ensayo con un gen indicador, por ejemplo, en una línea celular BHK transfectada de manera estable que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta a cAMP (CRE, por sus siglas en inglés) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). Cuando se produce cAMP como resultado de la activación del receptor de GLP-1 esto a su vez conlleva que se exprese la luciferasa. Se puede determinar la luciferasa añadiendo luciferina, que la enzima convierte en oxiluciferina y produce bioluminiscencia, que se mide y es una medida de la potencia *in vitro*. En el Ejemplo 21 se describe un ejemplo no limitante de un ensayo de este tipo.

30 La expresión «mitad de la concentración eficaz máxima» (EC_{50}) se refiere por lo general a la concentración que induce una respuesta intermedia entre la línea base y el máximo, haciendo referencia a la curva de respuesta a la dosis. La EC_{50} se utiliza como una medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración con la que se observa el 50% de su efecto máximo.

35 La potencia *in vitro* de los derivados de la invención se puede determinar tal como se ha descrito anteriormente y determinar la EC_{50} del derivado en cuestión. Cuanto más bajo sea el valor de la EC_{50} , mejor será la potencia.

40 En una realización más particular, el derivado de la invención tiene una potencia *in vitro* que corresponde a una EC_{50} igual o inferior a 10 000 pM, más preferentemente inferior a 5000 pM, aún más preferentemente inferior a 1000 pM o de la manera más preferida inferior a 500 pM (por ejemplo, determinada tal como se describe en el Ejemplo 20).

45 En una realización aún más particular, el derivado de la invención tiene una potencia que corresponde a una EC_{50} con un 0% de HSA inferior a 400 pM, preferentemente inferior a 300 pM, más preferentemente inferior a 200 pM, aún más preferentemente inferior a 150 pM o de la manera más preferida inferior a 100 pM (por ejemplo, determinada tal como se describe en el Ejemplo 21).

50 Asimismo, o como alternativa, la capacidad de los derivados de la invención de unirse al receptor de GLP-1 (afinidad por el receptor) se puede medir y, si es relevante, utilizar como una medida de la actividad GLP-1. Por ejemplo, las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable que expresa el receptor de GLP-1 humano se puede estimular con el análogo o derivado de GLP-1 en cuestión y medir su capacidad de desplazar ^{125}I -GLP-1 del receptor. Esto se puede determinar, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 22. Por lo general, la unión al receptor de GLP-1 con una concentración baja de albúmina debe ser tan buena como sea posible, lo que corresponde a un valor de IC_{50} bajo. En realizaciones particulares, el valor de IC_{50} de un derivado de la invención, en presencia de un 0.001% de HSA (poca albúmina) es inferior al valor correspondiente de IC_{50} para la semaglutida, preferentemente inferior a un 90% de este, más preferentemente inferior a un 80% de este, aún más preferentemente inferior a un 70% de este o de la manera más preferida inferior a un 50% de este.

55 En otra realización particular, los derivados de la invención son potentes *in vivo*, lo que se puede determinar tal como existe constancia en la técnica en cualquier modelo en animales adecuado así como también en ensayos clínicos.

El ratón diabético db/db es un ejemplo de un modelo en animales adecuado y el efecto hipoglucémico en sangre y/o el efecto de pérdida de peso corporal se puede determinar en tales ratones *in vivo*, para el efecto de pérdida de peso corporal preferentemente después de una administración de una única dosis.

- 5 El cerdo LYD es otro ejemplo de un modelo en animales adecuado y la reducción de la ingesta de alimentos se puede determinar en un estudio PD en tales cerdos *in vivo*, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 25. Los derivados de la invención son muy potentes *in vivo*, lo que se pone en evidencia por una apreciable reducción en la ingesta de alimentos en este estudio PD en cerdos.

Prolongación - unión al receptor/poca y mucha albúmina

De acuerdo con el segundo aspecto, los derivados de la invención son prolongados.

- 10 La capacidad de los derivados de la invención para unirse al receptor de GLP-1 en presencia de una concentración baja y elevada de albúmina, respectivamente, se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 22.

Por lo general, la unión al receptor de GLP-1 con una concentración baja de albúmina debe ser tan buena como sea posible, lo que corresponde a un valor de IC₅₀ bajo.

- 15 El valor de IC₅₀ con una concentración elevada de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Tal y como se sabe, los derivados de GLP-1 también se unen a la albúmina. Por lo general, este es un efecto deseable, que prolonga su permanencia en el plasma. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ con una concentración elevada de albúmina será, por lo general, más elevado que el valor de IC₅₀ con una concentración baja de albúmina, lo que corresponde a una reducción de la unión al receptor de GLP-1 provocada por la unión de la albúmina que compite por la unión al receptor de GLP-1.

- 20 Asimismo, o como alternativa, la unión de los derivados a la albúmina se puede medir utilizando el ensayo del Ejemplo 21, que se puede llevar a cabo tanto en ausencia de albúmina sérica como en presencia de albúmina sérica. Un aumento de la potencia *in vitro*, valor de EC₅₀, en presencia de albúmina sérica indica una afinidad por la albúmina sérica y representa un método para predecir un perfil farmacocinético prolongado de la sustancia de prueba en los modelos en animales.

- 25 Prolongación - semivida *in vivo*

De acuerdo con el segundo aspecto, los derivados de la invención son prolongados.

La prolongación se puede determinar como semivida de eliminación (T_{1/2}) *in vivo* en ratas después de la administración i.v., tal como se describe en el Ejemplo 24. En realizaciones particulares, la semivida en ratas es de al menos 10 horas, preferentemente al menos 12 horas o de la manera más preferida al menos 15 horas.

- 30 O, la prolongación se puede determinar en otra especie animal, por ejemplo, como semivida de eliminación (T_{1/2}) *in vivo* en minicerdos después de la administración i.v., tal como se describe en el Ejemplo 23. En realizaciones particulares, la semivida de eliminación en minicerdos es de al menos 8 horas, preferentemente al menos 24 horas, aún más preferentemente al menos 40 horas, todavía más preferentemente al menos 60 horas o de la manera más preferida al menos 80 horas.

- 35 Sorprendentemente, los inventores de la presente identificaron una clase novedosa de derivados de GLP-1 objeto de la presente invención, que tienen una potencia elevada y a la vez, preferentemente, una semivida larga.

Biodisponibilidad oral

De acuerdo con el tercer aspecto, los derivados de la invención tienen una elevada biodisponibilidad oral.

- 40 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 la administración i.v. o s.c. también es baja.

En consecuencia, en la técnica se necesitan derivados de GLP-1 con una mejor biodisponibilidad oral. Tales derivados podrían ser candidatos adecuados para la administración oral, siempre que, por lo general, su potencia sea principalmente satisfactoria y/o siempre que su semivida sea también, por lo general, satisfactoria.

- 45 Por lo general, el término biodisponibilidad se refiere a la fracción de una dosis administrada de un principio activo farmacéutico (API, por sus siglas en inglés), tal como un derivado de la invención, que alcanza la circulación sistémica sin haber variado. Por definición, cuando se administra un API por vía intravenosa, su biodisponibilidad es un 100%. Sin embargo, cuando se administra mediante otras vías (tal como vía oral) su biodisponibilidad disminuye (debido a la degradación y/o absorción completa y metabolismo de primer paso). La información sobre la biodisponibilidad es importante cuando se calculan las dosificaciones para las vías de administración no intravenosa.

- 50 La biodisponibilidad oral absoluta compara la biodisponibilidad (estimada como el área bajo la curva o AUC) del API en la circulación sistémica tras la administración oral, con la biodisponibilidad del mismo API tras la administración

intravenosa. Es la fracción del API absorbido mediante la administración que no es intravenosa comparada con la administración intravenosa correspondiente del mismo API. Si se utilizan diferentes dosis la comparación se debe normalizar respecto a la dosis; en consecuencia cada AUC se corrige dividiendo por la correspondiente dosis administrada.

- 5 Se obtiene un gráfico de la concentración plasmática del API frente al tiempo después de la administración oral e intravenosa. La biodisponibilidad absoluta (F) es, con la corrección para la dosis, la AUC oral dividida por la AUC intravenosa.

10 En una realización particular, el derivado de la invención tiene una biodisponibilidad oral absoluta que es superior que la de la semaglutida, preferentemente al menos un 10% superior, más preferentemente al menos un 20% superior, aún más preferentemente al menos un 30% superior o de la manera más preferida al menos un 40% superior. En realizaciones particulares adicionales, tiene una biodisponibilidad oral absoluta que es al menos 1.5 veces la de la semaglutida, preferentemente al menos 2.0 veces, más preferentemente al menos 3.0 veces, aún más preferentemente al menos 4.0 veces o de la manera más preferida al menos 5.0 veces la de la semaglutida.

15 Antes de estudiar la biodisponibilidad oral, los derivados de la invención se pueden formular de manera conveniente tal como existe constancia en el campo de las formulaciones orales de los compuestos insulino-trópicos, por ejemplo, utilizando una o más cualesquiera de las formulaciones descritas en el documento WO 2008/145728.

20 En una realización particular, los derivados de la invención tienen una estabilidad gastrointestinal muy buena. La estabilidad gastrointestinal se puede determinar *in vitro*, incubando el derivado con un extracto del sistema gastrointestinal de seres humanos diluido de manera adecuada, o de una especie animal relevante tal como minicerdos, cerdos LYD, perros o ratas, en condiciones relevantes desde un punto de vista fisiológico y durante un periodo de tiempo relevante desde un punto de vista fisiológico. La estabilidad se puede mejorar aún más cuando el derivado se combina con uno o más inhibidores enzimáticos relevantes en una cantidad eficaz. La estabilidad gastrointestinal *in vitro* se puede medir utilizando métodos habituales conocidos en la técnica. Preferentemente, la estabilidad gastrointestinal de los derivados de la invención mejora en comparación con la semaglutida y/o en comparación con el derivado del Ejemplo 2 del documento WO 2011/080103 A1. Preferentemente, el derivado de la invención es al menos tan estable como cualquiera de estos dos compuestos comparativos, preferentemente la estabilidad mejora en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%; más preferentemente en al menos un 75%, al menos un 100%, al menos un 150%, al menos un 175% o al menos un 200%, en comparación con la estabilidad de cualquiera de estos dos compuestos comparativos.

30 Propiedades biofísicas

De acuerdo con el cuarto aspecto, los derivados de la invención tienen buenas propiedades biofísicas. Estas propiedades incluyen, sin carácter limitante, estabilidad física y/o solubilidad. Se pueden medir estas y otras propiedades biofísicas utilizando métodos habituales conocidos en el campo de la química de proteínas. En una realización particular, estas propiedades mejoran en comparación con el GLP-1 natural (SEQ ID NO:1). La variación de las propiedades oligoméricas de los derivados puede ser responsable al menos en parte de la mejora de las propiedades biofísicas.

Se describen realizaciones particulares adicionales de los derivados de la invención en las secciones tituladas «REALIZACIONES PARTICULARES» y «REALIZACIONES PARTICULARES ADICIONALES» antes de la sección experimental.

40 **Procesos de producción**

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

45 El resto GLP-1 de los derivados de la invención, es decir, GLP-1 (7-37) o un análogo de este, se puede generar, por ejemplo, mediante la síntesis clásica de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la química de *t*-Boc o Fmoc u otras técnicas muy consolidadas; remítase, por ejemplo, a 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.

50 Asimismo, o como alternativa, se pueden producir mediante métodos recombinantes, es decir, cultivando una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el péptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido. Son ejemplos no limitantes de células hospedadoras adecuadas para la expresión de estos péptidos: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también las líneas celulares de mamíferos BHK o CHO.

55 Estos derivados de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o miméticos mono- o dipeptídicos N-terminales unidos covalentemente se pueden producir, por ejemplo, tal como se describe en la parte experimental. O remítase, por ejemplo, a Hodgson *et al.*: "The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids",

Chemical Society Reviews, vol. 33, n.º 7 (2004), págs. 422-430; y el documento WO 2009/083549 A1 titulado "Semi-recombinant preparation of GLP-1 analogues".

En la parte experimental se incluyen ejemplos específicos de métodos para preparar varios de los derivados de la invención.

5 Composiciones farmacéuticas

La composición farmacéutica que comprende un derivado de la invención, o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este, y un excipiente farmacéuticamente aceptable se puede preparar tal como se conoce en la técnica.

10 El término «excipiente» se refiere de manera amplia a cualquier componente que no es el principio o principios activos terapéuticos. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva y/o una sustancia que no es activa como un medicamento.

El excipiente puede tener varias finalidades, por ejemplo, como portador, vehículo, diluyente, adyuvante del comprimido y/o para mejorar la administración y/o la absorción de la sustancia activa.

15 En la técnica existe constancia de la formulación de principios farmacéuticamente activos con varios excipientes, remítase, por ejemplo, a Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo, 19.ª edición (1995), y cualesquiera ediciones posteriores).

Son ejemplos no limitantes de los excipientes: los disolventes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes quelantes y estabilizantes.

20 Los ejemplos de las formulaciones incluyen formaciones líquidas, es decir, formulaciones acuosas, es decir, formulaciones que comprenden agua. Una formulación líquida puede ser una solución o una suspensión. Una formulación acuosa comprende normalmente al menos un 50% en peso de agua o al menos un 60%, 70%, 80% o incluso al menos un 90% en peso de agua.

25 Como alternativa, una composición farmacéutica puede ser una formulación sólida, por ejemplo, una composición liofilizada o secada por aspersión, que se puede utilizar tal cual o a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

El pH en una formulación acuosa puede tener cualquier valor entre pH 3 y pH 10, por ejemplo, de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 9.5; o de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 7.0.

30 Una composición farmacéutica puede comprender un tampón. El tampón se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico y mezclas de estos.

35 Una composición farmacéutica puede comprender un conservante. El conservante se puede seleccionar, por ejemplo, a partir 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, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, *p*-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3*p*-clorfenoxipropano-1,2-diol) y mezclas de estos. El conservante puede estar presente con una concentración de 0.1 mg/mL a 20 mg/mL.

40 Una composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico. El agente isotónico se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo constituido por una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o azúcar alcohólico, un aminoácido (por ejemplo, glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y mezclas de estos. Se puede utilizar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, almidón hidroxietílico y carboximetilcelulosa-Na. Un azúcar alcohólico se define como un hidrocarburo C4-C8 que contiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol.

45 Una composición farmacéutica puede comprender un agente quelante. Se puede seleccionar un agente quelante, por ejemplo, entre sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de estas.

50 Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizante. El estabilizante puede ser, por ejemplo, uno o más inhibidores de la oxidación, inhibidores de la agregación, surfactantes y/o uno o más inhibidores de proteasas.

La expresión «formación de agregados» se refiere a una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden seguir siendo solubles, o agregados grandes visibles que

- precipitan a partir de la solución. La formación de agregados por parte de un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de manera adversa la actividad biológica de ese polipéptido, lo que da como resultado una pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, 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 tipo aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados del péptido durante el almacenamiento de la composición. La expresión «base de tipo aminoácido» se refiere a uno o más aminoácidos (tales como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano o treonina) o análogos de estos. Cualquier aminoácido puede estar presente en su forma básica libre o en su forma salina. Puede estar presente cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una mezcla de estos) de la base de tipo aminoácido.
- Se puede añadir metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o análogos de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina en sulfóxido de metionina cuando el péptido es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible de tal oxidación. Se puede utilizar cualquier estereoisómero de la metionina (L o D) o combinaciones de estos.
- Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizador seleccionado a partir del grupo de polímeros de peso molecular elevado o compuestos moleculares bajos. El estabilizador se puede seleccionar entre polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de esta (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio).
- Una composición farmacéutica puede comprender agentes estabilizantes adicionales tales como, 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 la congelación-descongelación o el cizallamiento mecánico.
- Una composición farmacéutica puede comprender uno o más surfactantes, por ejemplo, un surfactante, al menos un surfactante o diferentes surfactantes. El término «surfactante» se refiere a cualesquiera moléculas o iones que comprenden una parte hidrosoluble (hidrófila) y una parte liposoluble (lipófila). El surfactante se puede seleccionar, por ejemplo, a partir del grupo constituido por surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes no iónicos y/o surfactantes zwitteriónicos.
- Una composición farmacéutica puede comprender uno o más inhibidores de proteasas tales como, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y/o benzamidina-HCl.
- Los ingredientes adicionales, opcionales, de una composición farmacéutica incluyen, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes formadores de masa, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana o gelatina) y/o un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como la betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).
- Aún más, se puede formular una composición farmacéutica tal como existe constancia en el campo de las formulaciones orales de los compuestos insulínotropicos, por ejemplo, utilizando una o más cualesquiera de las formulaciones descritas en el documento WO 2008/145728.
- Una dosis administrada puede contener 0.01 mg - 100 mg del derivado, o 0.01-50 mg, o 0.01-20 mg, o 0.01 mg - 10 mg del derivado.
- El derivado se puede administrar en forma de una composición farmacéutica. Se puede administrar a un paciente que lo necesite en varios puntos, por ejemplo, en puntos tópicos tales como la piel o puntos mucosales; en puntos en los que no se produzca absorción tales como en una arteria, en una vena o en el corazón; y en puntos que conlleven absorción tales como en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.
- La vía 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 alveolos o una combinación de estos; parenteral, epidérmica; dérmica; transdérmica; conjuntival; uretral; vaginal; rectal; y/o ocular. En una realización particular, la vía de administración es oral.
- Se puede administrar una composición en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como una solución; una suspensión; una emulsión; una microemulsión; emulsiones múltiples; una espuma; un bálsamo; una pasta; una escayola; un ungüento; un comprimido; un comprimido recubierto; un chicle; un enjuague; una cápsula tal como cápsulas de gelatina duras o blandas; un supositorio; una cápsula rectal; gotas; un gel; un espray; un polvo; un aerosol; un inhalatorio; gotas oftálmicas; un ungüento oftálmico; un enjuague oftálmico; un óvulo vaginal; un anillo vaginal; un ungüento vaginal; una solución para inyección; una solución de transformación *in situ* tal como gelificación *in situ*, endurecimiento, precipitación y cristalización *in situ*; una solución para infusión; o como un implante. Además, se puede mezclar una composición en un portador farmacológico o sistema de suministro

farmacológico, por ejemplo, para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y/o solubilidad. Se puede unir una composición a un sistema de este tipo mediante interacciones covalentes, hidrófobas y/o electrostáticas. El objetivo de tal mezcla puede ser, por ejemplo, reducir los efectos adversos, conseguir la cronoterapia y/o aumentar el cumplimiento terapéutico del paciente.

- 5 También se puede utilizar una composición en la formulación de sistemas de suministro farmacológico de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y/o lenta.

Se puede llevar a cabo la administración parenteral mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa utilizando una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla en forma de bolígrafo o mediante una bomba de infusión.

- 10 Se puede administrar una composición por vía nasal en forma de una solución, una suspensión o un polvo; se puede administrar por vía pulmonar en forma de un espray en polvo o líquido.

La administración transdérmica es otra opción adicional más, por ejemplo, mediante inyección sin jeringuilla, desde un parche tal como un parche iontoforético o mediante una vía transmucosal, por ejemplo, por vía bucal.

- 15 Una composición puede ser una composición estabilizada. La expresión «formulación estabilizada» se refiere a una formulación con una mayor estabilidad física y/o química, preferentemente ambas. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con las condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta que se alcance la fecha de caducidad.

- 20 La expresión «estabilidad física» se refiere a la tendencia del polipéptido a formar agregados insolubles y/o inactivos desde un punto de vista biológico como resultado de la exposición al estrés termomecánico y/o interacción con interfases y superficies (tales como superficies hidrófobas) desestabilizantes. La estabilidad física de una formulación polipeptídica acuosa se puede evaluar por medio de la inspección visual y/o mediante medidas de la turbidez después de la exposición a un estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo. Como alternativa, se puede evaluar la estabilidad física utilizando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional del polipéptido tal como, por ejemplo, tioflavina T o sondas del «parche hidrofóbico».
- 25

- La expresión «estabilidad química» se refiere a los cambios químicos (en particular covalentes) en la estructura del polipéptido que dan lugar a la formación de productos de degradación química que tienen potencialmente una menor potencia biológica y/o un mayor efecto inmunógeno en comparación con el polipéptido intacto. Se puede evaluar la estabilidad química midiendo la cantidad de productos de degradación química en diferentes puntos temporales después de la exposición a diferentes condiciones ambientales, por ejemplo, mediante SEC-HPLC y/o RP-HPLC.
- 30

- El tratamiento con un derivado de acuerdo con la presente invención también se puede combinar con una o más sustancias activas desde un punto de vista farmacológico adicionales, por ejemplo, seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes contra la obesidad, agentes reguladores del apetito, agentes contra la hipertensión, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas con ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados con ella. Son ejemplos de estas sustancias activas desde un punto de vista farmacológico: La insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasas, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas que participan en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan en el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal del calcio tales como nifedipina, felodipina, nifedipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y bloqueantes α tales como doxazosina, urapidil, prazosina y terazosina; agonistas de tipo CART (transcrito regulado de cocaína y anfetamina), antagonistas de tipo NPY (neuropéptido Y), agonistas de tipo PPY, agonistas del receptor Y2, agonistas del receptor Y4, agonistas del receptor mixto Y2/Y4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de tipo orexina, agonistas de tipo TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de tipo CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de tipo CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de tipo urocortina, agonistas de $\beta 3$, oxintomodulina y análogos, agonistas de tipo MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de tipo MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de tipo CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos noradrenérgicos y de serotonina mixtos, agonistas de tipo 5HT (serotonina), agonistas de tipo bombesina, antagonistas de tipo galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de tipo TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de tipo leptina, agonistas de tipo DA (bromocriptina, doprexina),
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

inhibidores de lipasas/amilasas, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas de TR β ; antagonistas de tipo histamina H3, agonistas o antagonistas del polipéptido inhibidor gástrico, gastrina y análogos de gastrina.

El tratamiento con un derivado de acuerdo con esta invención también se puede combinar con una cirugía que inflencie la cantidad de glucosa y/o homeostasis lipídica tal como el cerclaje gástrico o la derivación gástrica.

5 Indicaciones farmacéuticas

La presente invención también se refiere al uso de un derivado de la invención como un medicamento.

En realizaciones particulares, el derivado de la invención se puede utilizar para los siguientes tratamientos médicos, todos relacionados preferentemente de una manera u otra con la diabetes:

- 10 (i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1, diabetes no dependiente de la insulina, MODY (diabetes del adulto de comienzo juvenil), diabetes gestacional y/o para reducir HbA1C;
- 15 (ii) retraso o prevención de la evolución de la enfermedad diabética, tal como evolución de la diabetes de tipo 2, retraso de la evolución de la tolerancia alterada a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés) en diabetes de tipo 2 que requiere insulina y/o retraso de la evolución de la diabetes de tipo 2 que no requiere insulina en diabetes de tipo 2 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 las células β y/o para restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β ;
- (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos;
- 20 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos de la alimentación tales como la obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de la saciedad; tratamiento o prevención del trastorno de sobreingesta compulsiva, bulimia nerviosa y/o obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la movilidad gástrica y/o retraso del vaciado gástrico;
- 25 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como la neuropatía que incluye la neuropatía periférica; nefropatía por retinopatía;
- (vii) mejora de los parámetros lipídicos tales como la prevención y/o tratamiento de la dislipidemia, reducción de los lípidos séricos totales; reducción del HDL; reducción del LDL pequeño y denso; reducción del VLDL:
- 30 (viii) reducción de los triglicéridos; reducción del colesterol; aumento del HDL; reducción de la cantidad plasmática de lipoproteína a (Lp(a)) en un ser humano; inhibición de la generación de la apolipoproteína a (apo(a)) *in vitro* y/o *in vivo*;
- 35 (ix) (iix) prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como el síndrome X; aterosclerosis; infarto de miocardio; cardiopatía coronaria; accidente cerebrovascular, isquemia cerebral; una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana tal como la hipertrofia ventricular izquierda; arteriopatía coronaria; hipertensión esencial; urgencia hipertensiva aguda; cardiomiopatía; insuficiencia cardíaca; tolerancia al esfuerzo; insuficiencia cardíaca crónica; arritmia; disritmia cardíaca; síncope; aterosclerosis; insuficiencia cardíaca crónica moderada; angina de pecho; reoclusión de la derivación cardíaca; claudicación intermitente (*atherosclerosis obliterans*); disfunción diastólica; y/o disfunción sistólica;
- 40 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales tales como el síndrome del intestino irritable; síndrome del intestino delgado o enfermedad de Crohn; dispepsia; y/o úlceras gástricas;
- 45 (xi) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tal como el tratamiento de un paciente enfermo en estado crítico, un paciente con una enfermedad por polinefropatía crítica (CIPNP, por sus siglas en inglés) y/o un potencial paciente de CIPNP; prevención de la enfermedad crítica o desarrollo de CIPNP; prevención, tratamiento y/o cura del síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) en un paciente; y/o para la prevención o reducción de la probabilidad de que un paciente padezca una bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o
- (xii) prevención y/o tratamiento del síndrome del ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés).

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

En otra realización particular, la indicación es (i). En una realización más particular, la indicación es (v). En una realización aún más particular, la indicación es (v).

Son especialmente preferidas las siguientes indicaciones: Diabetes de tipo 2 y/u obesidad.

Realizaciones particulares

5 Las siguientes son realizaciones particulares de la invención:

1. Un derivado de un péptido GLP-1,

donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y ocho cambios de aminoácidos como máximo en comparación con GLP-1 (7-37),

10 donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, donde

el resto de prolongación es Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y

15 el conector comprende



donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R_1 y R_2 representan de manera independiente *H o *CH_3 y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 2. El derivado de la realización 1, donde w es 0.

3. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-2, donde el conector comprende



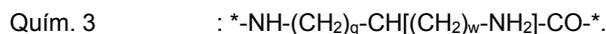
4. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-3, donde q su número entero en el intervalo de 3-5.

5. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-4, donde q es 4.

25 6. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-5, donde R_1 y R_2 son idénticos.

7. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-6, donde R_1 y R_2 representan ambos *H .

8. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-7, donde el conector comprende



9. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-8, donde el conector comprende

30 $\text{Quím. 4} \quad : \text{*NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH(NH}_2\text{)-CO-}^*$

10. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-9, donde Quím. 3a es un di-radical de lisina.

11. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-10, donde Quím. 4a es un di-radical de lisina.

12. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-11, donde Quím. 3 es un di-radical de lisina.

13. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-12, donde Quím. 4 es un di-radical de lisina.

35 14. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-13, donde el conector comprende

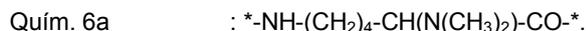


15. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-14, donde R_1 y R_2 representan ambos *CH_3 .

16. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-15, donde Quím. 3a es un di-radical de un residuo de N^α, N^α -dimetilisina (6-amino-(S)-2-(dimetilamino)hexanoilo).

17. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-16, donde Quím. 4a es un di-radical de lisina.

18. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-17, donde el conector comprende



19. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-18, donde el conector comprende z veces Quím. 3a, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

20. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-19, donde el conector comprende z veces Quím. 4a, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

21. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-20, donde el conector comprende z veces Quím. 3, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

22. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-21, donde el conector comprende z veces Quím. 4, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

23. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-22, donde el conector comprende z veces Quím. 6a, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

24. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-23, donde el conector comprende z veces Quím. 6, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

25. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-24, donde z es 1.

26. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-25, donde z es 2.

27. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-26, donde cuando z es 2, los dos elementos Quím. 3a, Quím. 4a, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 6a, o Quím. 6, respectivamente, están interconectados mediante un enlace de tipo amida.

28. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-27, donde el conector comprende

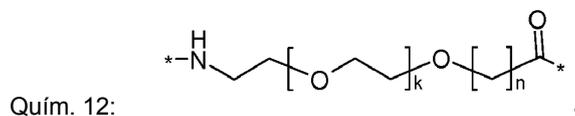


29. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-28, donde el conector comprende 2xQuím. 6a: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-^*$.

30. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-29, donde el elemento Quím. 3a, Quím. 4a, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 6a, Quím. 6, 2xQuím. 6, o 2xQuím. 6a, respectivamente, está conectado en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K del péptido GLP-1.

31. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-30, donde Quím. 3a, Quím. 4a, Quím. 6, Quím. 6a, Quím. 3, Quím. 4, 2xQuím. 6, o 2xQuím. 6a, respectivamente, es un primer elemento conector.

32. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-31, donde el conector comprende un segundo elemento conector, Quím. 12:



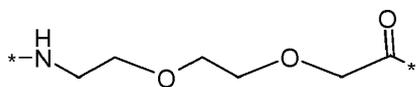
donde k es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

33. El derivado de la realización 32, donde k es 1.

34. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-33, donde n es 1.

35. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-34, donde el segundo elemento conector es

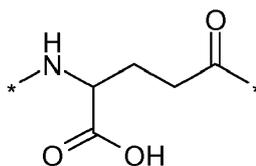
Quím. 13:



36. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-35, donde Quím. 13 se incluye m veces, donde m es 0 o un número entero en el intervalo de 1-2.

37. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-36, donde m es 0.
38. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-36, donde m es 1.
39. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-26, donde m es 2.
40. El derivado de cualquiera de las realizaciones 32-39, donde cuando m no es 1, los elementos Quím. 13 están interconectados mediante un enlace o enlaces de tipo amida.
41. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-40, donde el conector comprende un tercer elemento conector de Quím. 14:

Quím. 14:



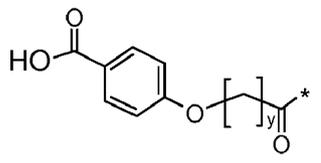
42. El derivado de la realización 41, donde Quím. 14 se incluye p veces, donde p es 0 o un número entero en el intervalo de 1-3.
43. El derivado de la realización 42, donde p es 0.
44. El derivado de la realización 42, donde p es 1.
45. El derivado de cualquiera de las realizaciones 42-44, donde Quím. 14 es un di-radical de L-Glu.
46. El derivado de cualquiera de las realizaciones 42-45, donde cuando p no es 0 ni 1, los elementos Quím. 14 están interconectados mediante un enlace o enlaces de tipo amida.
47. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-46, donde el conector y el resto de prolongación están interconectados mediante un enlace de tipo amida.
48. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-47, donde el conector y el péptido GLP-1 están interconectados mediante un enlace de tipo amida.
49. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-48, donde el conector está unido a un grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K.
50. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-49 donde el conector está constituido por Quím. 14 y dos veces Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.
51. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-49 donde el conector está constituido por Quím. 14, dos veces Quím. 13 y dos veces Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.
52. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-49 donde el conector está constituido por Quím. 14, dos veces Quím. 13 y Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-Quím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.
53. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-49 donde el conector está constituido por Quím. 14 y dos veces Quím. 6a (Quím.14-2xQuím.6a), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.
54. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-53, donde y es un número impar.
55. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-53, donde y es un número par.
56. El derivado de la realización 54, donde y es 9.
57. El derivado de la realización 54, donde y es 11.

58. El derivado de la realización 55, donde y es 10.

59. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-58, donde Quím. 2 se representa mediante

(i)

Quím. 2a:

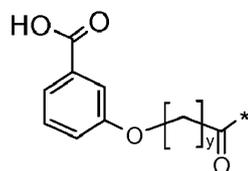


5

o

(ii)

Quím. 2b:



10 60. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-59, donde los dos restos de prolongación son sustancialmente idénticos.

61. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-60, donde los dos restos de prolongación tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

15 62. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-61, donde los dos conectores son sustancialmente idénticos.

63. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-62, donde los dos conectores tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

20 64. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-83, donde las dos cadenas laterales constituidas por el resto de prolongación y el conector son sustancialmente idénticas.

65. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-64, donde las dos cadenas laterales constituidas por el resto de prolongación y el conector tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

25 66. El derivado de cualquiera de las realizaciones 60-65, donde las dos estructuras químicas que se van a comparar se representan como huellas, tales como a) huellas ECFP₆; b) huellas UNITY; y/o c) huellas MDL; y donde para cada una de a), b) y c) se usa preferentemente el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud de las dos huellas.

67. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-66, donde el primer residuo de K se denomina K²⁶.

30 68. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-67, donde el segundo residuo de K se denomina K³⁴.

69. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-68, donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

70. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-69, donde la posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

35 71. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-70, donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

72. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-71, donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.

73. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-72, donde la posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
- 5 74. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-73, donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
75. El derivado de cualquiera de las realizaciones 72-74, donde el programa de alineación es una alineación de Needleman-Wunsch.
76. El derivado de cualquiera de las realizaciones 72-75, donde se utiliza la matriz de calificación por defecto y la matriz de identidad por defecto.
- 10 77. El derivado de cualquiera de las realizaciones 72-76, donde la matriz de calificación es BLOSUM62.
78. El derivado de cualquiera de las realizaciones 72-77, donde la penalización por el primer residuo en un hueco es -10 (menos diez).
79. El derivado de cualquiera de las realizaciones 72-78, donde la penalización por residuos adicionales en un hueco es -0.5 (menos cero punto cinco).
- 15 80. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-79, donde el péptido no comprende residuos de K a excepción del primer y el segundo residuo de K.
81. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-80, donde el péptido es GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).
82. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-80, donde el péptido es un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).
- 20 83. El derivado de la realización 82, donde el cambio o los cambios de aminoácidos se producen en una o más posiciones que corresponden a las siguientes posiciones de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1): Posición 7, 8, 22 y/o 30.
84. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-83, donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Imp⁷, Aib⁸, E²² y/o E³⁰.
85. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-84, donde el análogo comprende Imp⁷.
- 25 86. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-85, donde el análogo comprende Aib⁸.
87. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-86, donde el análogo comprende E²².
88. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-86, donde el análogo no comprende E²².
89. El derivado de cualquiera de las realizaciones 82-88, donde el análogo comprende E³⁰.
- 30 90. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-89, donde, para determinar los cambios en el péptido, la secuencia de aminoácidos del péptido se compara con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural.
91. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-90, donde, para determinar una posición en un péptido que corresponde a una posición específica en el GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural, la secuencia de aminoácidos del péptido se compara con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural.
- 35 92. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-91, donde la comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se realiza mediante la escritura y una inspección a ojo.
93. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-92, donde la comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se realiza utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
- 40 94. El derivado de la realización 93, donde el programa de alineación es una alineación de Needleman-Wunsch.
95. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-94, donde se utiliza la matriz de calificación por defecto y la matriz de identidad por defecto.
96. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-95, donde la matriz de calificación es BLOSUM62.
- 45 97. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-96, donde la penalización por el primer residuo en un hueco es -10 (menos diez).

98. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-97, donde la penalización por residuos adicionales en un hueco es -0.5 (menos cero punto cinco).
99. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-98, donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.
- 5 100. El derivado de cualquiera de las realizaciones 93-99, donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica tal como se describe para la posición 26 y la posición 34 en cualquiera de las realizaciones 55-62.
101. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-100, donde el péptido tiene como máximo tres cambios de aminoácidos.
- 10 102. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-101, donde el péptido tiene como máximo dos cambios de aminoácidos.
103. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-102, donde el péptido tiene como máximo un cambio de aminoácidos.
- 15 104. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-103, donde el péptido no tiene ningún (0) cambios de aminoácidos.
105. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-104, donde el péptido tiene como mínimo una modificación de aminoácidos.
106. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-105, donde el péptido tiene como mínimo dos cambios de aminoácidos.
- 20 107. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-106, donde el péptido tiene como mínimo tres cambios de aminoácidos.
108. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-107, donde el péptido tiene un cambio de aminoácidos.
109. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-108, donde el péptido tiene dos cambios de aminoácidos.
110. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-109, donde el péptido tiene tres cambios de aminoácidos.
- 25 111. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-110, donde los cambios, si los hay, son sustituciones.
112. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-111, donde el análogo a) comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I; y/o b) es un análogo de GLP-1 de Fórmula I:

Fórmula I : Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-
Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Lys-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈,

30 donde

Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo (Imp), α-hidroxihistidina, D-histidina, desaminohistidina (desH), 2-aminohistidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, N^ε-acetilhistidina, N^ε-formilhistidina, α-fluorometilhistidina, α-metilhistidina, 3-piridylalanina, 2-piridylalanina o 4-piridilalanina;

35 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, (1-aminociclohexil)carboxílico, (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;

Xaa₁₂ es Phe o Leu;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Val o Leu;

40 Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu o Arg;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃₁ es Trp o His

Xaa₃₃ es Val;

5 Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg o Gly;

Xaa₃₇ es Gly o Arg; y

Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg o está ausente.

113. El derivado de la realización 112, donde el péptido de Fórmula I es un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

10 114. El derivado de la realización 112, donde el péptido de Fórmula I es GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

115. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-114, donde Xaa₇ es His o Imp (desH); Xaa₈ es Ala o Aib; Xaa₁₂ es Phe; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly o Glu; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala o Glu; Xaa₃₁ es Trp; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Gln; Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Gly; y Xaa₃₈ está ausente.

15 116. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-115, donde Xaa₇ es His.

117. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-115, donde Xaa₇ es Imp.

118. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-117, donde Xaa₈ es Ala.

119. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-117, donde Xaa₈ es Aib.

120. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-119, donde Xaa₁₂ es Phe.

20 121. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-120, donde Xaa₁₆ es Val.

122. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-121, donde Xaa₁₈ es Ser.

123. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-122, donde Xaa₁₉ es Tyr.

124. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-123, donde Xaa₂₀ es Leu.

125. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-124, donde Xaa₂₂ es Gly.

25 126. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-124, donde Xaa₂₂ es Glu.

127. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-124, donde Xaa₂₂ no es Glu.

128. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-127, donde Xaa₂₃ es Gln.

129. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-128, donde Xaa₂₅ es Ala.

130. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-129, donde Xaa₂₇ es Glu.

30 131. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-130, donde Xaa₃₀ es Ala.

132. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-130, donde Xaa₃₀ es Glu.

133. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-132, donde Xaa₃₁ es Trp.

134. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-133, donde Xaa₃₃ es Val.

135. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-134, donde Xaa₃₅ es Gly.

35 136. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-135, donde Xaa₃₆ es Arg.

137. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-136, donde Xaa₃₇ es Gly.

138. El derivado de cualquiera de las realizaciones 112-137, donde Xaa₃₈ está ausente.

139. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-138, donde el péptido comprende los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1):
- (i) 8Aib; (ii) 7Imp, 8Aib; (iii) 8Aib, 22E; o (iv) 8Aib, 22E, 30E.
- 5 140. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-139, donde el péptido presenta los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1):
- (i) 8Aib; (ii) 7Imp, 8Aib; (iii) 8Aib, 22E; o (iv) 8Aib, 22E, 30E.
- 10 141. Un compuesto, preferentemente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-140 seleccionado entre los siguientes: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31, Quím. 32, Quím. 33, Quím. 34, Quím. 35, Quím. 36, Quím. 37 y Quím. 38; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.
142. Un compuesto, preferentemente un compuesto de la realización 141, caracterizado por su nombre y seleccionado de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-18 de la presente; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.
143. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-142, que presenta actividad GLP-1.
- 15 144. El derivado de la realización 143, donde la actividad GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
145. El derivado de la realización 144, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo *in vitro*, como la potencia de la producción de cAMP.
146. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-145 que tiene la potencia correspondiente a una EC₅₀
- 20 a) inferior a 10 000 pM, preferentemente inferior a 8000 pM, más preferentemente inferior a 5000 pM, aún más preferentemente inferior a 4000 pM o de la manera más preferida inferior a 3000 pM;
- b) inferior a 2000 pM, preferentemente inferior a 1200 pM, más preferentemente inferior a 1000 pM, aún más preferentemente inferior a 800 pM o de la manera más preferida inferior a 600 pM;
- 25 c) inferior a 400 pM, preferentemente inferior a 300 pM, más preferentemente inferior a 200 pM, aún más preferentemente inferior a 150 pM o de la manera más preferida inferior a 100 pM; o
- d) inferior a 80 pM, preferentemente inferior a 60 pM, más preferentemente inferior a 50 pM, aún más preferentemente inferior a 40 pM o de la manera más preferida inferior a 30 pM.
147. El derivado de la realización 146, donde la potencia se determina como la EC₅₀ para simular la formación de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, tal como un medio con la siguiente composición (concentraciones finales en el ensayo) TRIS-HCl 50 mM; HEPES 5 mM; MgCl₂, 6H₂O 10 mM; NaCl 150 mM; 0.01% de Tween; 0.1% de BSA; IBMX 0.5 mM; ATP 1 mM; GTP 1 μM, preferentemente utilizando una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13) y/o utilizando para la determinación de cAMP un ensayo del receptor funcional, por ejemplo, basado en la competencia entre el cAMP formado de manera endógena y el cAMP marcado con biotina añadido de manera exógena, en dicho ensayo, preferentemente, se captura el cAMP utilizando un anticuerpo específico y/o donde un ensayo aún más preferido es el ensayo AlphaScreen cAMP, de la manera más preferida el descrito en el Ejemplo 20.
- 30 148. El derivado de cualquiera de las realizaciones 144-145, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo *in vitro*, en un ensayo con un gen indicador.
149. El derivado de la realización 148, donde el ensayo se lleva a cabo en una línea celular BHK transfectada de manera estable que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta a cAMP (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa).
- 40 150. El derivado de la realización 149, donde cuando ha finalizado la incubación del ensayo se añade luciferina y se mide la luminiscencia.
151. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-150, donde el ensayo se lleva a cabo en ausencia de albúmina sérica (0% de HSA, concentración final en el ensayo).
- 45 152. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-151, donde el ensayo se lleva a cabo en presencia de un 1% de albúmina sérica (HSA, concentración final en el ensayo).
153. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-152, donde las células son células BHK con BHK-ts13 como una línea celular progenitora.

154. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-153, donde las células se derivan del clon FCW467-12A.
155. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-154, donde las células se cultivan con un 5% de CO₂ en un medio de cultivo celular, se obtienen alícuotas y se almacenan en nitrógeno líquido.
- 5 156. El derivado de la realización 155, donde el medio de cultivo celular es un 10% de FBS (siglas en inglés de suero bovino fetal), 1 mg/mL de G418, MTX (metotrexato) 240 nM y 1% de pen/estrep (penicilina/estreptomicina).
157. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-156, donde antes de cada ensayo se toma una alícuota del cultivo celular y se lava dos veces en PBS antes de suspenderla en la concentración deseada en el tampón de ensayo.
- 10 158. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-157, donde para las placas de 96 pocillos se lleva a cabo la suspensión para obtener una concentración final de 5×10^3 células/pocillo.
159. El derivado de cualquiera de las realizaciones 157-158, donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 1%, que está constituido por un 2% de ovalbúmina, 0.2% de Pluronic F-68 y un 2% de HSA en medio de ensayo.
160. El derivado de cualquiera de las realizaciones 157-158, donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 0%, que está constituido por un 2% de ovalbúmina y un 0.2% de Pluronic F-68 en medio de ensayo.
- 15 161. El derivado de cualquiera de las realizaciones 159-160, donde el medio de ensayo está constituido por DMEM sin rojo de fenol, Hepes 10 mM y 1x Glutamax.
162. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-161, donde el procedimiento del ensayo comprende las siguientes etapas:
- i) Las reservas de células se descongelan en un baño de agua a 37 °C;
 - 20 ii) las células se lavan tres veces en PBS;
 - iii) las células se cuentan y se ajustan a 5×10^3 células/50 μ L (1×10^5 células/mL) en medio de ensayo y se transfiere una alícuota de 50 μ L de células a cada pocillo en la placa de ensayo;
 - 25 iv) las reservas de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia, si hay alguno, se diluyen hasta una concentración de 0.2 μ M en tampón de ensayo al 0% para el ensayo con 0% de HSA o tampón de ensayo al 1% para el ensayo con 1% de HSA; y los compuestos se diluyen 10 veces para obtener un intervalo adecuado de concentraciones (tales como: 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M; 2×10^{-9} M, 2×10^{-10} M, 2×10^{-11} M, 2×10^{-12} M y 2×10^{-13} M), y para cada compuesto también se incluye un control con un blanco de tampón de ensayo;
 - 30 v) se transfiere una alícuota de 50 μ L de un compuesto o blanco por triplicado desde la placa de dilución hasta la placa de ensayo y los compuestos se estudian con concentraciones adecuadas (tales como las siguientes concentraciones finales: 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M y 1×10^{-13} M);
 - vi) la placa de ensayo se incuba durante 3 h en un incubador con un 5% de CO₂ a 37°C;
 - vii) la placa de ensayo se retira del incubador y se permite que esté a la temperatura ambiente durante 15 min;
 - 35 ixx) se añade una alícuota de luciferina (tal como el reactivo steadylite plus) de 100 μ L a cada pocillo de la placa de ensayo;
 - ix) se cubre cada placa de ensayo para protegerla de la luz y se agita durante 30 min a la temperatura ambiente; y
 - x) se lee cada placa de ensayo, por ejemplo, en un instrumento TopCount NXT de Packard.
- 40 163. El derivado de la realización 162, donde los datos del instrumento TopCount se transfieren al software GraphPad Prism 5 para los cálculos deseados.
164. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-163, donde se promedian los valores para cada triplicado, se realiza una regresión no lineal y se calculan los valores de EC₅₀.
- 45 165. El derivado de cualquiera de las realizaciones 162-164, donde la regresión es log(agonista) frente a la respuesta-pendiente de la variable (cuatro parámetros).
166. El derivado de cualquiera de las realizaciones 144-195, donde la potencia se determina tal como se ha descrito en cualquiera de las realizaciones 148-165.

ES 2 629 735 T3

167. El derivado de la realización 166, donde la potencia se determina tal como se ha descrito en el Ejemplo 21.
168. El derivado de cualquiera de las realizaciones 143-167 que tiene la potencia correspondiente a una EC_{50} con un 0% de HSA
- 5 a) inferior a 400 pM, preferentemente inferior a 300 pM, más preferentemente inferior a 200 pM, aún más preferentemente inferior a 150 pM o de la manera más preferida inferior a 100 pM;
- b) inferior a 80 pM, preferentemente inferior a 60 pM, más preferentemente inferior a 50 pM, aún más preferentemente inferior a 40 pM o de la manera más preferida inferior a 30 pM; o
- c) inferior a 25 pM, preferentemente inferior a 20 pM, más preferentemente inferior a 15 pM, aún más preferentemente inferior a 10 pM o de la manera más preferida inferior a 8.0 pM.
- 10 169. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-168, cuyo valor de EC_{50} no es superior a 20 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
170. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-169, cuyo valor de EC_{50} no es superior a 15 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
- 15 171. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-170, cuyo valor de EC_{50} no es superior a 10 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
172. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-171, cuyo valor de EC_{50} no es superior a 5 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
173. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-172, cuyo valor de EC_{50} no es superior a 2,5 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
- 20 174. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-173, cuyo valor de EC_{50} es inferior al valor de EC_{50} de la semaglutida.
175. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-174, cuyo valor de EC_{50} es inferior a 0.75 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
- 25 176. El derivado de cualquiera de las realizaciones 148-175, cuyo valor de EC_{50} es inferior a 0.50 veces el valor de EC_{50} de la semaglutida.
177. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-166, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de aproximadamente un 0.001% de HSA (poca albúmina) es
- 30 a) inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 250 nM, más preferentemente inferior a 100 nM o de la manera más preferida inferior a 50 nM;
- b) inferior a 12 nM, preferentemente inferior a 10 nM, más preferentemente inferior a 8.0 nM, aún más preferentemente inferior a 6.0 nM, todavía más preferentemente inferior a 5.0 nM o de la manera más preferida inferior a 3.0 nM;
- c) inferior a 2.0 nM, preferentemente inferior a 1.0 nM, aún más preferentemente inferior a 0.80 nM o de la manera más preferida inferior a 0.60 nM; o
- 35 d) inferior a 0.40 nM, preferentemente inferior a 0.30 nM, aún más preferentemente inferior a 0.20 nM o de la manera más preferida inferior a 0.10 nM.
178. El derivado de la realización 144, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide como la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de aproximadamente un 0.001% de HSA (poca albúmina).
- 40 179. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-178, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de aproximadamente un 2.0% de HSA (mucho albúmina) es
- a) inferior a 1000 nM, preferentemente inferior a 900 nM, más preferentemente inferior a 800 nM;
- b) inferior a 700 nM, preferentemente inferior a 500 nM, más preferentemente inferior a 300 nM; o
- c) inferior a 200 nM, preferentemente inferior a 100 nM o más preferentemente inferior a 50 nM.
- 45 180. El derivado de cualquiera de las realizaciones 177-179, donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide en función del desplazamiento de ^{125}I -GLP-1 del receptor, preferentemente utilizando un ensayo de unión SPA.

181. El derivado de cualquiera de las realizaciones 177-180, donde el receptor de GLP-1 se prepara utilizando una línea celular transfectada estable, preferentemente una línea celular de hámster, más preferentemente una línea celular renal de una cría de hámster tal como BHK tk-ts13.
- 5 182. El derivado de cualquiera de las realizaciones 177-181, donde el valor de IC₅₀ se determina como la concentración con la que se desplaza un 50% de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.
183. El derivado de cualquiera de las realizaciones 177-182, donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) se determina tal como se describe en el Ejemplo 22.
184. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-183, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es superior a la de la semaglutida.
- 10 185. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-184, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es superior a la de la liraglutida.
186. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-185, donde el derivado es eficaz para reducir la glucosa en sangre *in vivo* en ratones db/db.
- 15 187. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-186, donde el derivado es eficaz para reducir el peso corporal *in vivo* en ratones db/db.
188. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-187, el cual, en un estudio PD en cerdos, reduce la ingesta de alimentos en el día 1, 2, 3 y/o 4 después de la administración s.c. de una única dosis del derivado, en comparación con un grupo de control tratado con el vehículo.
- 20 189. El derivado de la realización 188, donde la dosis es de 0.3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg; preferentemente de 3.0 nmol/kg.
190. El derivado de cualquiera de las realizaciones 188-189, donde la ingesta de alimentos en el día 1 es de un 80% o inferior, preferentemente de un 60% o inferior, más preferentemente de un 50% o inferior o de la manera más preferida de un 40% o inferior, donde el porcentaje es relativo a la ingesta de alimentos del grupo de control.
- 25 191. El derivado de cualquiera de las realizaciones 188-190, donde la ingesta de alimentos en el día 2 es de un 80% o inferior, preferentemente de un 60% o inferior o más preferentemente de un 40% o inferior, donde el porcentaje es relativo a la ingesta de alimentos del grupo de control.
192. El derivado de cualquiera de las realizaciones 188-191, donde el estudio se lleva a cabo y los datos se compilan y analizan tal como se describe en el Ejemplo 25.
- 30 193. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-192, el cual tiene un perfil de acción más prolongado que la liraglutida.
194. El derivado de la realización 193, donde la prolongación se refiere a la semivida *in vivo* en una especie animal relevante, tal como ratones db/db, ratas, cerdos y/o, preferentemente, minicerdos; donde el derivado se administra i) s.c. y/o ii) i.v.; preferentemente ii) i.v.
- 35 195. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-194, donde la semivida de eliminación (T_{1/2}) después de la administración i.v. en ratas es superior a la de la semaglutida.
196. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-195, donde la semivida de eliminación (T_{1/2}) después de la administración i.v. en ratas es al menos a) un 25% superior, b) un 50% superior, c) un 75% superior, d) un 100% superior (=el doble) o e) un 150% superior que la semivida de eliminación de la semaglutida.
- 40 197. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-196, donde la semivida de eliminación (T_{1/2}) después de la administración i.v. en ratas es al menos dos veces, preferentemente al menos 2½ veces la semivida de eliminación de la semaglutida.
198. El derivado de cualquiera de las realizaciones 193-197, donde la semivida se determina en estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 24.
- 45 199. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-198, donde la semivida de eliminación (T_{1/2}) después de la administración i.v. en minicerdos es
- a) de al menos 8 horas, preferentemente de al menos 16 horas, más preferentemente de al menos 24 horas, aún más preferentemente de al menos 32 horas o de la manera más preferida de al menos 40 horas;
 - b) de al menos 50 horas, preferentemente de al menos 55 horas, más preferentemente de al menos 60 horas, aún más preferentemente de al menos 65 horas; o

- c) de al menos 70 horas, preferentemente de al menos 75 horas, más preferentemente de al menos 80 horas, todavía más preferentemente de al menos 85 horas o aún más preferentemente de al menos 90 horas.

200. El derivado de la realización 199, donde los minicerdos son minicerdos macho Göttingen.

5 201. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-200, donde los minicerdos tienen una edad de 7-14 meses y pesan preferentemente entre 16-35 kg.

202. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-201, donde a los minicerdos se les aloja de manera individual y se les alimenta una o dos veces al día, preferentemente con una dieta para minicerdos SDS.

203. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-202, donde la dosis del derivado se administra i.v. después de al menos 2 semanas de aclimatación.

10 204. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-203, donde se priva a los animales de alimentos durante aproximadamente 18 h antes de la administración de la dosis y entre 0 y 4 h después de la administración de la dosis y durante todo el periodo tienen acceso al agua sin restricciones.

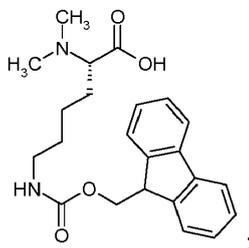
15 205. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-204, donde el derivado de GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4, hasta una concentración adecuada, preferentemente entre 20-60 nmol/mL.

206. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-205, donde la inyección intravenosa de los derivados se proporciona en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.

207. El derivado de cualquiera de las realizaciones 199-206, donde la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) se determina en estudios farmacocinéticos *in vivo* en minicerdos, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 23.

20 216. Un compuesto seleccionado entre el ácido (S)-2-dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxocarboxilamino)hexanoico; y

Quím. 39:



o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

25 217. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-207 como un medicamento.

218. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-207 en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.

30 219. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-207 en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.

35 La invención también se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, donde el análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y como máximo ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1 (7-37), donde el derivado comprende un primer y un segundo resto de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un primer y segundo conector, respectivamente, donde el primer y el segundo resto de prolongación es Quím. 2:

40 Quím. 2 : $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_y\text{-CO-}^*$,

en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y el primer y el segundo conector comprenden

Quím. 3a : $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH}[(\text{CH}_2\text{)}_w\text{-NR}_1\text{R}_2]\text{-CO-}^*$,

donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R₁ y R₂ representan de manera independiente *-H (un radical de hidrógeno) o *-CH₃ (metilo) y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este; así como también cualquiera de las realizaciones anteriores 2-220 anexas a este documento como realizaciones dependientes.

5 Realizaciones particulares adicionales

Las siguientes son realizaciones particulares adicionales de la invención:

1. Un derivado de un péptido GLP-1,

10 donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y ocho cambios de aminoácidos como máximo en comparación con GLP-1 (7-37),

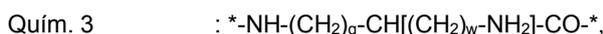
donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, donde

el resto de prolongación es Quím. 2:



15 en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y

el conector comprende



donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 2. El derivado de la realización 1, donde Quím. 3 está conectado en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K del péptido GLP-1.

3. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-2, donde el conector comprende z veces Quím. 3, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

4. El derivado de la realización 3, donde z es 1.

25 5. El derivado de la realización 3, donde z es 2.

6. El derivado de cualquiera de las realizaciones 3 y 5, donde cuando z es 2, los elementos Quím. 3 están interconectados mediante un enlace de tipo amida.

7. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-6, donde w es 0.

8. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-7, donde q es 4.

30 9. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-8, donde el conector comprende Quím. 4: *-NH-(CH₂)_q-CH(NH₂)-CO-*, donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

10. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-9, donde q es 4.

11. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-10, donde Quím. 3 o Quím. 4, respectivamente, es un di-radical de lisina.

35 12. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-11, donde el conector comprende

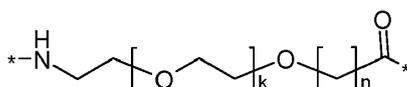


13. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-12, donde el conector comprende



40 14. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-13, donde Quím. 3, Quím. 4a, Quím. 6 o 2xQuím. 6, respectivamente, es un primer elemento conector.

15. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-14, donde el conector comprende un segundo elemento conector, Quím. 12:



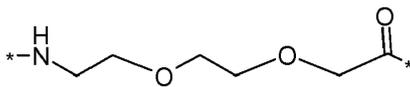
Quím. 12:

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

16. El derivado de la realización 15, donde k es 1.

17. El derivado de cualquiera de las realizaciones 15-16, donde n es 1.

5 18. El derivado de cualquiera de las realizaciones 15-17, donde el segundo elemento conector es



Quím. 13:

19. El derivado de cualquiera de las realizaciones 15-18, donde Quím. 13 se incluye m veces, donde m es 0 o un número entero en el intervalo de 1-2.

20. El derivado de la realización 10, donde m es 0, 1 o 2.

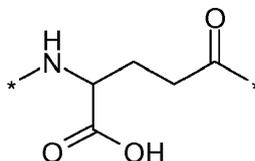
10 21. El derivado de cualquiera de las realizaciones 19-20, donde m es 0.

22. El derivado de cualquiera de las realizaciones 19-20, donde m es 1.

23. El derivado de cualquiera de las realizaciones 19-20, donde m es 2.

24. El derivado de cualquiera de las realizaciones 19-23, donde cuando m no es 1, los elementos Quím. 13 están interconectados mediante un enlace o enlaces de tipo amida.

15 25. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-24, donde el conector comprende un tercer elemento conector de Quím. 14:



Quím. 14:

26. El derivado de la realización 25, donde Quím. 14 se incluye p veces, donde p es 0 o un número entero en el intervalo de 1-3.

20 27. El derivado de la realización 25, donde p es 0.

28. El derivado de la realización 25, donde p es 1.

29. El derivado de cualquiera de las realizaciones 25-28, donde Quím. 14 es un di-radical de L-Glu.

30. El derivado de cualquiera de las realizaciones 25-29, donde cuando p no es 0 ni 1, los elementos Quím. 14 están interconectados mediante un enlace o enlaces de tipo amida.

25 31. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-30, donde el conector y el resto de prolongación están interconectados mediante un enlace de tipo amida.

32. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-31, donde el conector y el péptido GLP-1 están interconectados mediante un enlace de tipo amida.

30 33. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-32, donde el conector está unido a un grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K.

34. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-33 donde el conector está constituido por Quím. 14 y dos veces Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.

35 35. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-33 donde el conector está constituido por Quím. 14, dos veces Quím. 13 y dos veces Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-2xQuím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y

en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.

5 36. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-33 donde el conector está constituido por Quím. 14, dos veces Quím. 13 y Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-Quím.6), interconectados mediante enlaces de tipo amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo *-NH al extremo CO-* del resto de prolongación y en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o segundo residuo de K del péptido GLP-1.

37. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-36, donde y es un número impar.

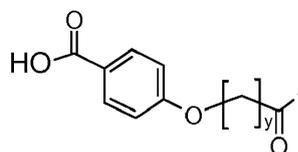
38. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-36, donde y es un número par.

39. El derivado de la realización 37, donde y es 9.

10 40. El derivado de la realización 37, donde y es 11.

41. El derivado de la realización 38, donde y es 10.

42. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-41, donde Quím. 2 se representa mediante



Quím. 2a:

15 43. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-42, donde los dos restos de prolongación son sustancialmente idénticos.

44. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-43, donde los dos restos de prolongación tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

45. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-44, donde los dos conectores son sustancialmente idénticos.

20 46. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-45, donde los dos conectores tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

47. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-46, donde las dos cadenas laterales constituidas por el resto de prolongación y el conector son sustancialmente idénticas.

25 48. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-47, donde las dos cadenas laterales constituidas por el resto de prolongación y el conector tienen una similitud de al menos 0.5; preferentemente de al menos 0.6; más preferentemente de al menos 0.7, o de al menos 0.8; aún más preferentemente de al menos 0.9; o de la manera más preferida de al menos 0.99, tal como una similitud de 1.0.

30 49. El derivado de cualquiera de las realizaciones 43-48, donde las dos estructuras químicas que se van a comparar se representan como huellas, tales como a) huellas ECFP_6; b) huellas UNITY; y/o c) huellas MDL; y donde para cada una de a), b) y c) se usa preferentemente el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud de las dos huellas.

50. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-49, donde el primer residuo de K se denomina K²⁶.

51. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-50, donde el segundo residuo de K se denomina K³⁴.

35 52. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-51, donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

53. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-52, donde la posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

40 54. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-53, donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.

55. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-54, donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.

56. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-55, donde la posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
57. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-65, donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
58. El derivado de cualquiera de las realizaciones 56-57, donde el programa de alineación es una alineación de Needleman-Wunsch.
59. El derivado de cualquiera de las realizaciones 57-58, donde se utiliza la matriz de calificación por defecto y la matriz de identidad por defecto.
60. El derivado de cualquiera de las realizaciones 57-59, donde la matriz de calificación es BLOSUM62.
61. El derivado de cualquiera de las realizaciones 57-60, donde la penalización por el primer residuo en un hueco es -10 (menos diez).
62. El derivado de cualquiera de las realizaciones 57-61, donde la penalización por residuos adicionales en un hueco es -0.5 (menos cero punto cinco).
63. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-62, donde el péptido no comprende residuos de K a excepción del primer y el segundo residuo de K.
64. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-63, donde el péptido es GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).
65. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-63, donde el péptido es un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).
66. El derivado de la realización 65, donde el cambio o los cambios de aminoácidos se producen en una o más posiciones que corresponden a las siguientes posiciones de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1): Posición 7, 8, 22 y/o 30.
67. El derivado de cualquiera de las realizaciones 65-66, donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Imp⁷, Aib⁸, E²² y/o E³⁰.
68. El derivado de cualquiera de las realizaciones 65-67, donde el análogo comprende Imp⁷.
69. El derivado de cualquiera de las realizaciones 65-68, donde el análogo comprende Aib⁸.
70. El derivado de cualquiera de las realizaciones 65-69, donde el análogo comprende E²².
71. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-69, donde el análogo no comprende E²².
72. El derivado de cualquiera de las realizaciones 65-71, donde el análogo comprende E³⁰.
73. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-72, donde, para determinar los cambios en el péptido, la secuencia de aminoácidos del péptido se compara con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural.
74. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-73, donde, para determinar una posición en un péptido que corresponde a una posición específica en el GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural, la secuencia de aminoácidos del péptido se compara con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) natural.
75. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-74, donde la comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se realiza mediante la escritura y una inspección a ojo.
76. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-75, donde la comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se realiza utilizando un programa de alineación de péptidos o proteínas estándar.
77. El derivado de la realización 76, donde el programa de alineación es una alineación de Needleman-Wunsch.
78. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-77, donde se utiliza la matriz de calificación por defecto y la matriz de identidad por defecto.
79. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-78, donde la matriz de calificación es BLOSUM62.
80. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-79, donde la penalización por el primer residuo en un hueco es -10 (menos diez).

81. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-80, donde la penalización por residuos adicionales en un hueco es -0.5 (menos cero punto cinco).
82. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-81, donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica mediante la escritura y una inspección a ojo.
- 5 83. El derivado de cualquiera de las realizaciones 76-82, donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1) se identifica tal como se describe para la posición 26 y la posición 34 en cualquiera de las realizaciones 55-62.
84. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-83, donde el péptido tiene como máximo tres cambios de aminoácidos.
- 10 85. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-84, donde el péptido tiene como máximo dos cambios de aminoácidos.
86. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-85, donde el péptido tiene como máximo un cambio de aminoácidos.
87. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-86, donde el péptido no tiene ningún (0) cambio de aminoácidos.
- 15 88. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-87, donde el péptido tiene como mínimo una modificación de aminoácidos.
89. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-88, donde el péptido tiene como mínimo dos cambios de aminoácidos.
- 20 90. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-89, donde el péptido tiene como mínimo tres cambios de aminoácidos.
91. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-90, donde el péptido tiene un cambio de aminoácidos.
92. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-90, donde el péptido tiene dos cambios de aminoácidos.
93. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-90, donde el péptido tiene tres cambios de aminoácidos.
94. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-93, donde los cambios, si los hay, son sustituciones.
- 25 95. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-94, donde el análogo a) comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I; y/o b) es un análogo de GLP-1 de Fórmula I:

Fórmula I : Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-
Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Lys-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈,

donde

- 30 Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo (Imp), α-hidroxihistidina, D-histidina, desaminohistidina (desH), 2-aminohistidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, N^α-acetilhistidina, N^α-formilhistidina, α-fluorometilhistidina, α-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;
- 35 Xaa₁₂ es Phe o Leu;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Val o Leu;
- Xaa₁₉ es Tyr o Gln;
- 40 Xaa₂₀ es Leu o Met;
- Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu o Arg;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃ es Trp o His

Xaa₃₃ es Val;

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

5 Xaa₃₆ es Arg o Gly;

Xaa₃₇ es Gly o Arg; y

Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg o está ausente.

96. El derivado de la realización 95, donde el péptido de Fórmula I es un análogo de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

97. El derivado de la realización 95, donde el péptido de Fórmula I es GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

10 98. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-97, donde Xaa₇ es His o Imp (desH); Xaa₈ es Ala o Aib; Xaa₁₂ es Phe; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu; Xaa₂₂ es Gly o Glu; Xaa₂₃ es Gln; Xaa₂₅ es Ala; Xaa₂₇ es Glu; Xaa₃₀ es Ala o Glu; Xaa₃₁ es Trp; Xaa₃₃ es Val; Xaa₃₄ es Gln; Xaa₃₅ es Gly; Xaa₃₆ es Arg; Xaa₃₇ es Gly; y Xaa₃₈ está ausente.

99. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-98, donde Xaa₇ es His.

15 100. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-98, donde Xaa₇ es Imp.

101. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-100, donde Xaa₈ es Ala.

102. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-100, donde Xaa₈ es Aib.

103. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-102, donde Xaa₁₂ es Phe.

104. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-103, donde Xaa₁₆ es Val.

20 105. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-104, donde Xaa₁₈ es Ser.

106. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-105, donde Xaa₁₉ es Tyr.

107. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-106, donde Xaa₂₀ es Leu.

108. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-107, donde Xaa₂₂ es Gly.

109. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-107, donde Xaa₂₂ es Glu.

25 110. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-108, donde Xaa₂₂ no es Glu.

111. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-110, donde Xaa₂₃ es Gln.

112. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-111, donde Xaa₂₅ es Ala.

113. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-112, donde Xaa₂₇ es Glu.

114. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-113, donde Xaa₃₀ es Ala.

30 115. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-114, donde Xaa₃₀ es Glu.

116. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-115, donde Xaa₃₁ es Trp.

117. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-116, donde Xaa₃₃ es Val.

118. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-117, donde Xaa₃₅ es Gly.

119. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-118, donde Xaa₃₆ es Arg.

35 120. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-119, donde Xaa₃₇ es Gly.

121. El derivado de cualquiera de las realizaciones 95-120, donde Xaa₃₈ está ausente.

122. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-121, donde el péptido comprende los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1):

(i) 8Aib; (ii) 7Imp, 8Aib; (iii) 8Aib, 22E; o (iv) 8Aib, 22E, 30E.

123. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-122, donde el péptido presenta los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1):

(i) 8Aib; (ii) 7Imp, 8Aib; (iii) 8Aib, 22E; o (iv) 8Aib, 22E, 30E.

5 124. Un compuesto, preferentemente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-123 seleccionado entre los siguientes: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31 y Quím. 32; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 125. Un compuesto, preferentemente un compuesto de la realización 124, caracterizado por su nombre y seleccionado de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-12 de la presente; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

126. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-125, que presenta actividad GLP-1.

127. El derivado de la realización 126, donde la actividad GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.

15 128. El derivado de la realización 127, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo *in vitro*, como la potencia de la producción de cAMP.

129. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-128 que tiene la potencia correspondiente a una EC₅₀

a) inferior a 10000 pM, preferentemente inferior a 8000 pM, más preferentemente inferior a 5000 pM, aún más preferentemente inferior a 4000 pM o de la manera más preferida inferior a 3000 pM;

20 b) inferior a 2000 pM, preferentemente inferior a 1200 pM, más preferentemente inferior a 1000 pM, aún más preferentemente inferior a 800 pM o de la manera más preferida inferior a 600 pM;

c) inferior a 400 pM, preferentemente inferior a 300 pM, más preferentemente inferior a 200 pM, aún más preferentemente inferior a 150 pM o de la manera más preferida inferior a 100 pM; o

d) inferior a 80 pM, preferentemente inferior a 60 pM, más preferentemente inferior a 50 pM, aún más preferentemente inferior a 40 pM o de la manera más preferida inferior a 30 pM.

25 130. El derivado de la realización 129, donde la potencia se determina como la EC₅₀ para simular la formación de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, tal como un medio con la siguiente composición (concentraciones finales en el ensayo) TRIS-HCl 50 mM; HEPES 5 mM; MgCl₂, 6H₂O 10 mM; NaCl 150 mM; 0.01% de Tween; 0.1% de BSA; IBMX 0.5 mM; ATP 1 mM; GTP 1 μM, preferentemente utilizando una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13) y/o utilizando para la determinación de cAMP un ensayo del receptor funcional, por ejemplo, basado en la competencia entre el cAMP formado de manera endógena y el cAMP marcado con biotina añadido de manera exógena, en dicho ensayo, preferentemente, se captura el cAMP utilizando un anticuerpo específico y/o donde un ensayo aún más preferido es el ensayo AlphaScreen cAMP, de la manera más preferida el descrito en el Ejemplo 20.

35 131. El derivado de cualquiera de las realizaciones 127-128, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo *in vitro*, en un ensayo con un gen indicador.

132. El derivado de la realización 131, donde el ensayo se lleva a cabo en una línea celular BHK transfectada de manera estable que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta a cAMP (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa).

40 133. El derivado de la realización 132, donde cuando ha finalizado la incubación del ensayo se añade luciferina y se mide la luminiscencia.

134. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-133, donde el ensayo se lleva a cabo en ausencia de albúmina sérica (0% de HSA, concentración final en el ensayo).

135. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-134, donde el ensayo se lleva a cabo en presencia de un 1% de albúmina sérica (HSA, concentración final en el ensayo).

45 136. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-135, donde las células son células BHK con BHK-ts13 como una línea celular progenitora.

137. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-136, donde las células se derivan del clon FCW467-12A.

138. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-137, donde las células se cultivan con un 5% de CO₂ en un medio de cultivo celular, se obtienen alícuotas y se almacenan en nitrógeno líquido.

ES 2 629 735 T3

139. El derivado de la realización 138, donde el medio de cultivo celular es un 10% de FBS (siglas en inglés de suero bovino fetal), 1 mg/mL de G418, MTX (metotrexato) 240 nM y 1% de pen/estrep (penicilina/estreptomicina).
140. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-139, donde antes de cada ensayo se toma una alícuota del cultivo celular y se lava dos veces en PBS antes de suspenderla en la concentración deseada en el tampón de ensayo.
141. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-140, donde para las placas de 96 pocillos se lleva a cabo la suspensión para obtener una concentración final de 5×10^3 células/pocillo.
142. El derivado de cualquiera de las realizaciones 140-141, donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 1%, que está constituido por un 2% de ovalbúmina, 0.2% de Pluronic F-68 y un 2% de HSA en medio de ensayo.
143. El derivado de cualquiera de las realizaciones 140-141, donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 0%, que está constituido por un 2% de ovalbúmina y un 0.2% de Pluronic F-68 en medio de ensayo.
144. El derivado de cualquiera de las realizaciones 142-143, donde el medio de ensayo está constituido por DMEM sin rojo de fenol, Hepes 10 mM y 1x Glutamax.
145. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-144, donde el procedimiento del ensayo comprende las siguientes etapas:
- i) Las reservas de células se descongelan en un baño de agua a 37 °C;
 - ii) las células se lavan tres veces en PBS;
 - iii) las células se cuentan y se ajustan a 5×10^3 células/50 μ L (1×10^5 células/mL) en medio de ensayo y se transfiere una alícuota de 50 μ L de células a cada pocillo en la placa de ensayo;
 - iv) las reservas de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia, si hay alguno, se diluyen hasta una concentración de 0.2 μ M en tampón de ensayo al 0% para el ensayo con 0% de HSA o tampón de ensayo al 1% para el ensayo con 1% de HSA; y los compuestos se diluyen 10 veces para obtener un intervalo adecuado de concentraciones (tales como: 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M; 2×10^{-9} M, 2×10^{-10} M, 2×10^{-11} M, 2×10^{-12} M y 2×10^{-13} M), y para cada compuesto también se incluye un control con un blanco de tampón de ensayo;
 - v) se transfiere una alícuota de 50 μ L de un compuesto o blanco por triplicado desde la placa de dilución hasta la placa de ensayo y los compuestos se estudian con concentraciones adecuadas (tales como las siguientes concentraciones finales: 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M; 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M y 1×10^{-13} M);
 - vi) la placa de ensayo se incuba durante 3 h en un incubador con un 5% de CO₂ a 37°C;
 - vii) la placa de ensayo se retira del incubador y se permite que esté a la temperatura ambiente durante 15 min;
 - ixx) se añade una alícuota de luciferina (tal como el reactivo steadylite plus) de 100 μ L a cada pocillo de la placa de ensayo;
 - ix) se cubre cada placa de ensayo para protegerla de la luz y se agita durante 30 min a la temperatura ambiente; y
 - x) se lee cada placa de ensayo, por ejemplo, en un instrumento TopCount NXT de Packard.
146. El derivado de la realización 145, donde los datos del instrumento TopCount se transfieren al software GraphPad Prism 5 para los cálculos deseados.
147. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-146, donde se promedian los valores para cada triplicado, se realiza una regresión no lineal y se calculan los valores de EC₅₀.
148. El derivado de cualquiera de las realizaciones 145-147, donde la regresión es log(agonista) frente a la respuesta-pendiente de la variable (cuatro parámetros).
149. El derivado de cualquiera de las realizaciones 127-128, donde la potencia se determina tal como se ha descrito en cualquiera de las realizaciones 131-148.
150. El derivado de la realización 149, donde la potencia se determina tal como se ha descrito en el Ejemplo 21.
151. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-150, cuyo valor de EC₅₀ no es superior a 20 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.

152. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-151, cuyo valor de EC₅₀ no es superior a 15 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
153. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-152, cuyo valor de EC₅₀ no es superior a 10 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
- 5 154. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-153, cuyo valor de EC₅₀ no es superior a 5 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
155. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-154, cuyo valor de EC₅₀ no es superior a 2,5 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
- 10 156. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-155, cuyo valor de EC₅₀ es inferior al valor de EC₅₀ de la semaglutida.
157. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-156, cuyo valor de EC₅₀ es inferior a 0.75 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
158. El derivado de cualquiera de las realizaciones 131-157, cuyo valor de EC₅₀ es inferior a 0.50 veces el valor de EC₅₀ de la semaglutida.
- 15 159. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-158, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de aproximadamente un 0.001% de HSA (poca albúmina) es
- a) inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 250 nM, más preferentemente inferior a 100 nM o de la manera más preferida inferior a 50 nM;
- 20 b) inferior a 10 pM, preferentemente inferior a 8.0 pM, todavía más preferentemente inferior a 6.0 pM, aún más preferentemente inferior a 5.0 pM o de la manera más preferida inferior a 3.0 pM;
- c) inferior a 2.0 nM, preferentemente inferior a 1.0 nM, aún más preferentemente inferior a 0.80 nM o de la manera más preferida inferior a 0.60 nM; o
- d) inferior a 0.40 nM, preferentemente inferior a 0.30 nM, aún más preferentemente inferior a 0.20 nM o de la manera más preferida inferior a 0.10 nM.
- 25 160. El derivado de la realización 127, donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide como la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de aproximadamente un 0.001% de HSA (poca albúmina).
161. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-160, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de aproximadamente un 2.0% de HSA (mucho albúmina) es
- a) inferior a 1000 nM, preferentemente inferior a 800 nM;
- 30 b) inferior a 700 nM, preferentemente inferior a 500 nM, más preferentemente inferior a 300 nM; o
- c) inferior a 200 nM, preferentemente inferior a 100 nM o más preferentemente inferior a 50 nM.
162. El derivado de cualquiera de las realizaciones 159-161, donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide en función del desplazamiento de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor, preferentemente utilizando un ensayo de unión SPA.
- 35 163. El derivado de la realización 161, donde el receptor de GLP-1 se prepara utilizando una línea celular transfectada estable, preferentemente una línea celular de hámster, más preferentemente una línea celular renal de una cría de hámster tal como BHK tk-ts13.
164. El derivado de cualquiera de las realizaciones 159-163, donde el valor de IC₅₀ se determina como la concentración con la que se desplaza un 50% de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.
- 40 165. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-164, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es superior a la de la semaglutida.
166. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-165, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es superior a la de la liraglutida.
167. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-166, donde el derivado es eficaz para reducir la glucosa en sangre *in vivo* en ratones db/db.
- 45 168. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-167, donde el derivado es eficaz para reducir el peso corporal *in vivo* en ratones db/db.

169. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-168, el cual, en un estudio PD en cerdos, reduce la ingesta de alimentos en el día 1, 2, 3 y/o 4 después de la administración s.c. de una única dosis del derivado, en comparación con un grupo de control tratado con el vehículo.
- 5 170. El derivado de la realización 169, donde la dosis es de 0.3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg; preferentemente de 3.0 nmol/kg.
171. El derivado de cualquiera de las realizaciones 169-170, donde la ingesta de alimentos en el día 1 se reduce hasta un 80% o menos, preferentemente hasta un 60% o menos, más preferentemente hasta un 50% o menos o de la manera más preferida hasta un 40% o menos.
- 10 172. El derivado de cualquiera de las realizaciones 169-171, donde la ingesta de alimentos en el día 2 se reduce hasta un 80% o menos, preferentemente hasta un 60% o menos o más preferentemente hasta un 40% o menos.
173. El derivado de cualquiera de las realizaciones 169-172, donde el estudio se lleva a cabo y los datos se compilan y analizan tal como se describe en el Ejemplo 25.
174. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-173, el cual tiene un perfil de acción más prolongado que la liraglutida.
- 15 175. El derivado de la realización 174, donde la prolongación se refiere a la semivida *in vivo* en una especie animal relevante, tal como ratones db/db, ratas, cerdos y/o, preferentemente, minicerdos; donde el derivado se administra i) s.c. y/o ii) i.v.; preferentemente ii) i.v.
176. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-175, donde la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en ratas es superior a la de la semaglutida.
- 20 177. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-176, donde la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en ratas es al menos a) un 25% superior, b) un 50% superior, c) un 75% superior o d) un 100% superior (=el doble) que la semivida de eliminación de la semaglutida.
178. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-177, donde la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en ratas es al menos dos veces la semivida de eliminación de la semaglutida.
- 25 179. El derivado de cualquiera de las realizaciones 174-178, donde la semivida se determina en estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 24.
180. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-179, donde la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en minicerdos es
- 30 a) de al menos 8 horas, preferentemente de al menos 16 horas, más preferentemente de al menos 24 horas, aún más preferentemente de al menos 32 horas o de la manera más preferida de al menos 40 horas; o
- b) de al menos 50 horas, preferentemente de al menos 55 horas, más preferentemente de al menos 60 horas o aún más preferentemente de al menos 65 horas.
181. El derivado de la realización 180, donde los minicerdos son minicerdos macho Göttingen.
- 35 182. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-181, donde los minicerdos tienen una edad de 7-14 meses y pesan preferentemente entre 16-35 kg.
183. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-182, donde a los minicerdos se les aloja de manera individual y se les alimenta una o dos veces al día, preferentemente con una dieta para minicerdos SDS.
184. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-183, donde la dosis del derivado se administra i.v. después de al menos 2 semanas de aclimatación.
- 40 185. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-184, donde se priva a los animales de alimentos durante aproximadamente 18 h antes de la administración de la dosis y entre 0 y 4 h después de la administración de la dosis y durante todo el periodo tienen acceso al agua sin restricciones.
- 45 186. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-185, donde el derivado de GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4, hasta una concentración adecuada, preferentemente entre 20-60 nmol/mL.
187. El derivado de cualquiera de las realizaciones 180-186, donde la inyección intravenosa de los derivados se proporciona en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.
196. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-187 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

197. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-187 como un medicamento.

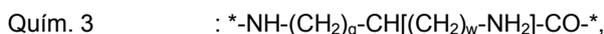
198. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-187 en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.

199. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-187 en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.

La invención también se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, donde el análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y como máximo ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1 (7-37), donde el derivado comprende un primer y un segundo resto de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un primer y segundo conector, respectivamente, donde el primer y el segundo resto de prolongación es Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y el primer y el segundo conector comprenden



donde q es un número entero en el intervalo de 0-5 y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este; así como también cualquiera de las realizaciones anteriores 2-200 anexas a este documento como realizaciones dependientes.

La invención también se refiere a

a). Un derivado de un péptido GLP-1,

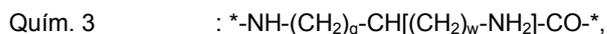
donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y ocho cambios de aminoácidos como máximo en comparación con GLP-1 (7-37);

donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, donde el resto de prolongación es Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13, y

el conector comprende Quím. 3:



donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

b). El derivado de la realización a), donde Quím. 3 está conectado en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K del péptido GLP-1.

c). El derivado de cualquiera de las realizaciones a)-b), donde el conector comprende z veces Quím. 3, donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

d). El derivado de cualquiera de las realizaciones a)-c), donde w es 0.

e). El derivado de cualquiera de las realizaciones a)-d), donde q es 4.

f). El derivado de cualquiera de las realizaciones a)-e), donde el conector comprende

Quím. 4 : *NH-(CH₂)_q-CH(NH₂)-CO*, donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

g). El derivado de cualquiera de las realizaciones a)-f), donde el conector comprende



Al inicio de esta parte experimental aparece una lista de abreviaturas y después una sección que incluye métodos generales para sintetizar y caracterizar los análogos y derivados de la invención. Después aparecen varios ejemplos relacionados con la preparación de derivados de GLP-1 específicos y al final se han incluido varios ejemplos relacionados con la actividad y propiedades de estos análogos y derivados (sección titulada métodos farmacológicos).

5

Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Lista de abreviaturas

	Aib:	Ácido α -aminoisobutírico
	AcOH:	Ácido acético
10	API:	Principio activo farmacéutico
	AUC:	Área bajo la curva
	BG:	Glucosa en sangre
	BHK	Riñón de cría de hámster
	BW:	Peso corporal
15	Boc:	<i>t</i> -Butiloxicarbonilo
	Bom:	Benciloximetilo
	BSA:	Albúmina sérica bovina
	Bzl:	Bencilo
	CAS:	<i>Chemical Abstracts Service</i> (Servicio de Resúmenes Científicos)
20	Cl _t :	2-Clorotritilo
	Colidina:	2,4,6-trimetilpiridina
	DCM:	Diclorometano
	Dde:	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
	DesH:	Desaminohistidina (también se puede denominar como ácido imidazopropiónico, Imp)
25	DIC:	Diisopropilcarbodiimida
	DIPEA:	Diisopropiletilamina
	DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
	EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
	EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
30	FBS:	Suero bovino fetal
	FCS:	Suero de ternero fetal
	Fmoc:	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
	HATU:	(Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio)
	HBTU:	(Hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio)
35	HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanosulfónico
	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:	Albúmina sérica humana
	IBMX:	3-Isobutil-1-metilxantina
	Imp:	Ácido imidazopropiónico (también denominado desaminohistidina, DesH)
5	i.v.	Por vía intravenosa
	ivDde:	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
	IVGTT:	Test intravenoso de tolerancia a la glucosa
	LCMS:	Cromatografía líquida - Espectroscopía de masas
	LYD:	Landrace Yorkshire Duroc
10	MALDI-MS:	Remítase a MALDI-TOF MS
	MALDI-TOF MS:	Espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por la matriz - Tiempo de vuelo
	MeOH:	Metanol
	Mmt:	4-Metoxitritilo
	Mtt:	4-Metiltritilo
15	MTX:	Metotrexato
	NMP:	<i>N</i> -metilpirrolidona
	OBz:	Éster de benzoilo
	OEG:	Ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
	OPfp:	Pentafluorofenoxi
20	OPnp:	<i>para</i> -Nitrofenoxi
	OSu:	Ésteres de <i>O</i> -succinimidilo (ésteres de hidroxisuccinimida)
	O <i>t</i> Bu:	Éster de <i>t</i> -butilo
	Oxyrna Pure ®:	Éster etílico del ácido cianohidroximinoacético
	Pbf:	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
25	PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
	PD:	Farmacodinámica
	Pen/Strep:	Penicilina/Estreptomina
	PK:	Farmacocinética
	RP:	Fase inversa
30	RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa
	RT:	Temperatura ambiente
	Rt:	Tiempo de retención
	s.c.:	Por vía subcutánea
	SD:	Desviación estándar
35	SEC-HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño
	SEM:	Error estándar de la media
	SPA:	Ensayo de centelleo por proximidad

	SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
	<i>t</i> Bu:	<i>tert</i> -Butilo
	TFA:	Ácido trifluoroacético
	TIS:	Triisopropilsilano
5	TLC:	Cromatografía de capa fina
	Tos:	Tosilato (o <i>para</i> -toluenosulfonilo)
	Tris:	Tris(hidroxiometil)aminometano o 2-amino-2-hidroxiometilpropano-1,3-diol
	Trt:	Trifenilmetilo (tritilo)
	Trx:	Ácido tranexámico
10	UPLC:	Cromatografía líquida de ultraresolución

Materiales y métodos

Materiales

	Complejo de α -picolina-borano (CAS 3999-38-0)
	Éster etílico del ácido cianohidroximinoacético (CAS 3849-21-6)
15	Ácido <i>N</i> - α , <i>N</i> - β -di-Fmoc-L-2,3-Diaminopropiónico (CAS 201473-90-7)
	Ácido 3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzoico (CAS 1421-49-4)
	Ácido 3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzoico (CAS 16225-26-6)
	Ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (CAS 166108-71-0)
20	Ácido 17-(9-fluorenilmetiloxycarbonilamino)-9-aza-3,6,12,15-tetraoxa-10-on-heptadecanoico (IRIS Biotech GmbH)
	Éster 1- <i>tert</i> -butilico del ácido Fmoc-L-glutámico (CAS 84793-07-7)
	Ácido 2-(2-metoxietoxi)acético (CAS 16024-56-9)
	<i>N</i> - α , <i>N</i> - ϵ -Bis(9-fluorenilmetiloxycarbonil)-L-lisina (CAS 78081-87-5)
	Ácido 1-[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]piperidine-4-carboxílico (CAS 148928-15-8)
25	Ácido Fmoc-8-aminocaprílico (CAS 126631-93-4)
	Ácido 4-fenilbutírico (CAS 1716-12-7)
	Ácido 4-(4-nitrofenil)butírico (CAS 5600-62-4)
	Ácido 4-(4-clorofenil)butírico (CAS 4619-18-5)
	Ácido Fmoc-6-aminohexanoico (CAS 88574-06-5)
30	Ácido Fmoc-12-aminododecanoico (CAS 128917-74-8)
	Éster <i>tert</i> -butilico del ácido 4-(9-carboxinoniloxi)benzoico (preparado tal como se describe en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204)
	Éster <i>tert</i> -butilico del ácido 4-(8-carboxioctiloxi)benzoico (M.p.: 71-72 °C).
35	¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃ , δ_H): 7.93 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2 H); 6.88 (d, <i>J</i> =8.9 Hz, 2 H); 4.00 (t, <i>J</i> =6.4 Hz, 2 H); 2.36 (t, <i>J</i> =7.4 Hz, 2 H); 1.80 (m, 2 H); 1.65 (m, 2 H); 1.59 (s, 9 H); 1.53-1.30 (m, 8 H) (preparado tal como se describe en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204, reemplazando el 10-bromodecanoato de metilo por 9-bromononanoato de etilo (CAS 28598-81-4))
40	Éster <i>tert</i> -butilico del ácido 4-(7-carboxiheptiloxi)benzoico (espectro de ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃ , δ_H): 7.93 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 2 H); 6.88 (d, <i>J</i> =9.0 Hz, 2 H); 4.00 (t, <i>J</i> =6.5 Hz, 2 H); 2.37 (t, <i>J</i> =7.4 Hz, 2 H); 1.80 (m, 2 H); 1.64 (m, 2 H); 1.59 (s, 9 H); 1.53-1.33 (m, 6 H)) (preparado tal como se describe en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204, reemplazando el 10-bromodecanoato de metilo por 7-bromoheptanoato de etilo (CAS 29823-18-5)).

Métodos químicos

Esta sección se divide en dos: Sección A, que se refiere a los métodos generales (de preparación (A1) y de detección y caracterización (A2)) y la Sección B, en la cual se describe la preparación y caracterización de varios ejemplos específicos de los compuestos.

5 A. Métodos generalesA1. Métodos de preparación

Esta sección se refiere a los métodos de la síntesis de péptidos en fase sólida (métodos de SPPS, incluidos los métodos para la desprotección de los aminoácidos, métodos para escindir el péptido de la resina y para su purificación, así como también métodos para detectar y caracterizar los péptidos resultantes (métodos de LCMS, MALDI y UPLC). La síntesis en fase sólida de los péptidos se puede mejorar en algunos casos utilizando dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que se pueda escindir en condiciones ácidas tal como, sin carácter limitante, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en los que está presente una treonina en el péptido, se pueden utilizar dipéptidos de pseudoprolina (se pueden adquirir, por ejemplo, de Novabiochem, remítase también a W.R. Sampson (1999), *J. Pep. Sci.* 5, 403). Los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc utilizados fueron los estándar recomendados: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH o Fmoc-Val-OH etc. suministrados por, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech o Novabiochem. Donde no se especifica nada más, se utilizan los aminoácidos en su forma L natural. El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa-amino (por ejemplo, Boc-His(Boc)-OH o Boc-His(Trt)-OH para los péptidos con His en el extremo N). En el caso de la unión modular del resto de unión a la albúmina utilizando SPPS, se utilizaron los siguientes componentes básicos protegidos de manera adecuada tales como, sin carácter limitante, el ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, el ácido Fmoc-tranexámico, Fmoc-Glu-OtBu, el éster mono-*tert*-butílico del ácido octadecanodioico, el éster mono-*tert*-butílico del ácido nonadecanodioico, el éster mono-*tert*-butílico del ácido tetradecanodioico o el éster *tert*-butílico del ácido 4-(9-carboxinonilo)benzoico. Todas las operaciones indicadas a continuación se realizaron a una escala de síntesis de 250 µmol.

1. Síntesis del esqueleto peptídico protegido unido a la resinaMétodo: SPPS_P

30 Se llevó a cabo SPPS_P en un Sintetizador de Péptidos en Fase Sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 EE. UU.) a una escala de 250 µmol utilizando un exceso de seis veces de Fmoc-aminoácidos (300 mM en NMP con HOAt u Oxyma Pure® 300 mM) respecto a la carga de la resina, por ejemplo, carga baja de Fmoc-Gly-Wang (0.35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó utilizando un 20% de piperidina en NMP. El acoplamiento se llevó a cabo utilizando 3 : 3 : 3 : 4 aminoácido/(HOAt u Oxyma Pure®)/DIC/colidina en NMP. Se llevaron a cabo lavados superiores con NMP y DCM (7 mL, 0.5 min, 2 x 2 cada uno) entre las etapas de desprotección y acoplamiento. Por lo general el tiempo de acoplamiento fue de 60 minutos. Algunos aminoácidos que incluyen, sin carácter limitante, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Aib-OH o Boc-His(Trt)-OH se «acoplaron de manera doble», lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 60 min), se drenó la resina y se añadieron más reactivos (aminoácido, (HOAt u Oxyma Pure®), DIC y colidina) y se permitió que la mezcla reaccionara de nuevo (por ejemplo, 60 min).

Método: SPPS_L

Se llevó a cabo SPPS_L en un sintetizador de péptidos Liberty con microondas de CEM Corp. (Matthews, NC 28106, EE. UU.) a una escala de 250 µmol o 100 µmol utilizando un exceso de seis veces de Fmoc-aminoácidos (300 mM en NMP con HOAt u Oxyma Pure® 300 mM) respecto a la carga de la resina, por ejemplo, carga baja de Fmoc-Gly-Wang (0.35 mmol/g). Se llevó a cabo la desprotección de Fmoc utilizando un 5% de piperidina en NMP a una temperatura de hasta 75 °C durante 30 segundos; después la resina se filtró y se lavó con NMP y la desprotección de Fmoc se repitió esta vez durante 2 minutos a 75 °C. El acoplamiento se llevó a cabo utilizando 1 : 1 : 1 aminoácido/(HOAt u Oxyma Pure®)/DIC en NMP. Por lo general, el tiempo de acoplamiento y la temperatura fueron de 5 minutos y de hasta 75 °C. Se utilizó un tiempo de acoplamiento más largo para las reacciones a mayor escala, por ejemplo, de 10 min. Los aminoácidos de tipo histidina se acoplaron de manera doble a 50 °C o se acoplaron de manera cuádruple si el anterior aminoácido estaba impedido desde un punto de vista estérico (por ejemplo, Aib). Los aminoácidos de tipo arginina se acoplaron a RT durante 25 minutos y a continuación se calentaron hasta 75 °C durante 5 min. Algunos aminoácidos tales como, sin carácter limitante, Aib, se «acoplaron de manera doble» lo que significa que tras el primer acoplamiento (por ejemplo, 5 min a 75 °C), se drenó la resina y se añadieron más reactivos (aminoácido, (HOAt u Oxyma Pure®) y DIC) y la mezcla se calentó de nuevo (por ejemplo, 5 min a 75 °C). Se llevaron a cabo lavados con NMP (5 x 10 mL) entre las etapas de desprotección y acoplamiento.

Método: SPPS_A

La resina peptidilo protegida se sintetizó de acuerdo con la estrategia Fmoc en un sintetizador de péptidos 433 de Applied Biosystems a una escala de 250 μmol o 1000 μmol con un exceso de Fmoc-aminoácidos de tres o cuatro veces, utilizando los protocolos FastMoc UV suministrados por el proveedor que emplean acoplamiento mediados por HBTU (2-(hexafluorofosfato de 1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en NMP y monitorización por UV para la desprotección del grupo protector Fmoc, en algunos casos se utilizaron acoplamiento dobles, lo que significa que tras el primer acoplamiento la resina se drena y se añaden más Fmoc-aminoácidos y reactivos. La resina de partida utilizada para la síntesis de las amidas peptídicas fue una resina Rink-Amida y una resina Wang precargada (por ejemplo, carga baja de Fmoc-Gly-Wang o Fmoc-Lys(Mtt)-wang) o resina de clorotritilo para los péptidos con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos utilizados fueron Fmoc-aminoácidos estándar (suministrados por, por ejemplo, Anaspec o Novabiochem) suministrados en cartuchos pesados previamente adecuados para el sintetizador ABI433A con la excepción de los aminoácidos no naturales tales como Fmoc-Aib-OH (ácido Fmoc-aminoisobutírico). El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa-amino (por ejemplo, se utilizó Boc-His(Boc)-OH o Boc-His(Trt)-OH para los péptidos con His N-terminal). En el grupo épsilon-amino de las lisinas de la secuencia se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la vía de unión del resto de unión a la albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos se puede mejorar en algunos casos utilizando dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que se pueda escindir en condiciones ácidas tal como, sin carácter limitante, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en los que esté presente en el péptido una serina o una treonina, se pueden utilizar dipéptidos de pseudoprolina (remítase, por ejemplo, al catálogo de Novobiochem 2009/2010 o la versión más nueva, o W.R. Sampson (1999), *J. Pep. Sci.* 5, 403).

Método: SPPS_M

SPPS_M se refiere a la síntesis de la resina de peptidilo protegida utilizando química de Fmoc manual. La química de acoplamiento fue DIC/(HOAt u Oxyma Pure®)/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 llevó a cabo con un 20-25% de piperidina en NMP (3 x 20 mL, 10 min cada vez) seguida por lavados con NMP (4 x 20 mL).

2. Síntesis de las cadenas laterales

Monoésteres de diácidos grasos

Cuando se calientan a reflujo durante toda la noche los diácidos C8, C10, C12, C14, C16 y C18 con anhídrido de Boc DMAP *t*-butanol en tolueno se obtiene predominantemente el monoéster de *t*-butilo. Después del tratamiento de la reacción se obtiene una mezcla del monoácido, diácido y diéster. La purificación se lleva a cabo mediante lavado, filtración a través de un lecho corto de sílice y recristalización.

3. Unión de las cadenas laterales al esqueleto peptídico protegido unido a la resina

Cuando está presente una acilación en una cadena lateral de lisina, el grupo épsilon-amino de la lisina que se va a acilar se protege con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la ruta de unión del resto de prolongación y el conector. La desprotección de Dde- o ivDde se llevó a cabo con un 2% de hidrazina en NMP (2 x 20 mL, 10 min cada vez) seguida por lavados con NMP (4 x 20 mL). La desprotección de Mtt o Mmt se llevó a cabo con un 2% de TFA y un 2-3% de TIS en DCM (5 x 20 mL, 10 min cada vez) seguida por lavados con DCM (2 x 20 mL), MeOH al 10% y DIPEA al 5% en DCM (2 x 20 ml) y NMP (4 x 20 ml) o mediante tratamiento con hexafluoroisopropanol/DCM (75:25, 5 x 20 ml, 10 min cada vez) seguido por lavados como los anteriores. En algunos casos el grupo Mtt se eliminó mediante etapas automáticas en el sintetizador de péptidos Liberty. Se llevó a cabo la desprotección de Mtt con hexafluoroisopropanol o hexafluoroisopropanol/DCM (75:25) a la temperatura ambiente durante 30 min seguida por lavados con DCM (7 mL x 5) y después lavados con NMP (7 mL x 5). El resto de prolongación y/o el conector se puede unir 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 prolongación y/o conector a la resina peptidilo protegida, la unión puede ser modular utilizando SPPS y componentes básicos protegidos de manera adecuada.

Método: SC_P

Se eliminó el grupo protector de N- ϵ -lisina tal como se ha descrito anteriormente y la modificación química de la lisina se llevó a cabo mediante una o más etapas automáticas en el sintetizador de péptidos Prelude utilizando componentes básicos protegidos de manera adecuada tal como se ha descrito anteriormente. Se llevaron a cabo acoplamiento dobles tal como se ha descrito en SPPS_P con acoplamiento de 3 horas.

Método: SC_L

Se eliminó el grupo protector de N- ϵ -lisina tal como se ha descrito anteriormente y la modificación química de la lisina se llevó a cabo mediante una o más etapas automáticas en el sintetizador de péptidos Liberty utilizando componentes básicos protegidos de manera adecuada tal como se ha descrito anteriormente. Los acoplamiento dobles se llevaron a cabo tal como se ha descrito en SPPS_L.

Método: SC_A

Se eliminó el grupo protector de N-ε-lisina tal como se ha descrito anteriormente y la modificación química de la lisina se llevó a cabo mediante una o más etapas automáticas en el sintetizador de péptidos ABI utilizando componentes básicos protegidos de manera adecuada tal como se ha descrito en SPPS_A.

Método: SC_M1

- 5 Se eliminó el grupo protector de N-ε-lisina tal como se ha descrito anteriormente. Se disolvió el resto de prolongación o conector activo (éster activo o anhídrido simétrico) tal como el monoéster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido octadecanodioico (Ebashi *et al.* EP511600, 4 equivalentes molares respecto al péptido unido a la resina) en NMP (25 mL), se añadió a la resina y se agitó durante toda la noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó exhaustivamente con NMP, DCM, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

10 *Método:* SC_M2

- Se eliminó el grupo protector de N-ε-lisina tal como se ha descrito anteriormente. El resto de prolongación se disolvió en NMP/DCM (1:1, 10 mL). Se añadió el reactivo activante tal como HOBt u Oxyma Pure® (4 equivalentes molares respecto a la resina) y DIC (4 equivalentes molares respecto a la resina) y la solución se agitó durante 15 min. La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares respecto a la resina). La resina se agitó de 2 a 24 horas a la temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2 x 20 mL), NMP/DCM (1:1, 2 x 20mL) y DCM (2 x 20 mL).

Método: SC_M3

- Se disolvió el resto de prolongación o conector activo (éster activo o anhídrido simétrico) tal como el monoéster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido octadecanodioico (Ebashi *et al.* EP511600), 1-1.5 equivalentes molares respecto al péptido unido a la resina, en un disolvente orgánico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mezcla 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 resto de prolongación tal como *tert*-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó durante toda la noche y el péptido crudo aislado se desprotegió posteriormente. En el caso de grupos protectores de tipo *tert*-butilo, la desprotección se llevó a cabo disolviendo el péptido en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 min se evaporó la mezcla al vacío y el péptido crudo se purificó mediante HPLC preparativa tal como se describe más adelante.

4. Escisión del péptido unido a la resina con o sin cadenas laterales unidas y purificación

Método: CP_M1

- Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIS/agua (95/2.5/2.5 o 92.5/5/2.5) seguido por precipitación con éter dietílico. El péptido se disolvió en un disolvente adecuado (tal como, por ejemplo, ácido acético al 30%) y se purificó mediante RP-HPLC estándar en una columna C18 de 5 μM utilizando acetonitrilo/agua/TFA. Las fracciones se analizaron mediante una combinación de métodos de UPLC, MALDI y LCMS y las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron.

Método: CP_L1

- Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina utilizando un Sistema de Escisión por Microondas CEM Accent (CEM Corp., Carolina del Norte). La escisión de la resina se llevó a cabo a 38 °C durante 30 minutos mediante tratamiento con TFA/TIS/agua (95/2.5/2.5) seguido por la precipitación con éter dietílico. El péptido se disolvió en un disolvente adecuado (tal como, por ejemplo, ácido acético al 30%) y se purificó mediante RP-HPLC estándar en una columna C18 de 5 μM utilizando acetonitrilo/agua/TFA. Las fracciones se analizaron mediante una combinación de métodos de UPLC, MALDI y LCMS y las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron.

A2. Métodos generales para la detección y caracterización

1. Métodos de LC-MS

Método: LCMS01v1

- Se llevó a cabo LCMS01v1 en una disposición constituida por un sistema de UPLC Acquity de Waters y un espectrómetro de masas LCT Premier XE de Micromass. Eluyentes:

A: 0.1% de ácido fórmico en agua

- B: 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo. El análisis se llevó a cabo a RT inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 2-1 μL) en la columna que se eluyó con un gradiente de A y B. Las condiciones de UPLC, configuración del detector y configuración del espectrómetro de masas fueron: Columna: Acquity UPLC BEH de Waters, C-18, 1.7 μm, 2.1 mm x 50mm. Gradiente: Lineal 5% - 95% de acetonitrilo durante 4.0 min (de manera alternativa 8.0 min) con 0.4 mL/min. Detección: 214 (emisión del análogo a partir de TUV (siglas en

inglés de detector de UV sintonizable)) medio de ionización MS: Barrido API-ES: 100-2000 amu (de manera alternativa 500-2000 amu), etapa 0.1 amu.

2. Métodos de UPLC

Método: UPLC02v1

5 El análisis RP se llevó a cabo utilizando un sistema UPLC de Waters equipado con un detector de banda dual. Se recogió la detección UV a 214 nm y 254 nm utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130A, 1.7µm, 2.1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema de UPLC se conectó a dos depósitos de eluyente que contenían: A: un 99.95% de H₂O, un 0.05% de TFA; B: un 99.95% de CH₃CN, un 0.05% de TFA. Se utilizó el siguiente gradiente lineal: de un 95% de A, 5% de B a un 95% de A, 5% B

10 *Método:* UPLC07v1

El análisis RP se llevó a cabo utilizando un sistema UPLC de Waters equipado con un detector de banda dual. Se recogió la detección UV a 214 nm y 254 nm utilizando una columna kinetex 1.7µ C18, 100A 2.1 x 150 mm, 60 °C. El sistema de UPLC se conectó a dos depósitos de eluyente que contenían: A: un 90% de agua y un 10% CH₃CN con (NH₄)₂HPO₄ 0.045 M, pH 3.6, B: un 20% de isopropanol, un 20% de agua y un 60% de CH₃CN. Se utilizó el siguiente gradiente en etapas: un 35% de B y un 65% de A durante 2 minutos, después de un 35% de B y un 65% de A a un 65% de B y un 35% de A durante 15 minutos, después de un 65% de B y un 35% de A a un 80% de B y un 20% de A durante 3 minutos con una tasa de flujo de 0.5 mL/min.

Método: UPLC06v1

20 El análisis RP se llevó a cabo utilizando un sistema UPLC de Waters equipado con un detector de banda dual. Se recogió la detección UV a 214 nm y 254 nm utilizando una columna kinetex 1.7µ C18, 100A 2.1 x 150 mm, 60 °C. El sistema de UPLC se conectó a dos depósitos de eluyente que contenían: A: Un 90% de agua y un 10% de MeCN con (NH₄)₂HPO₄ 0.045 M, pH 3.6, B: un 20% de isopropanol, un 20% de agua y un 60% de CH₃CN. Se utilizó el siguiente gradiente en etapas: un 25% de B y un 75% de A durante 2 minutos, después de un 25% de B y un 75% A a un 55% de B y un 45% de A durante 15 minutos, después de un 55% de B y un 45% de A a un 80% de B y un 20% de A durante 3 minutos con una tasa de flujo de 0.5 mL/min.

3. Método de MALDI-MS

Método: MALOI01v1

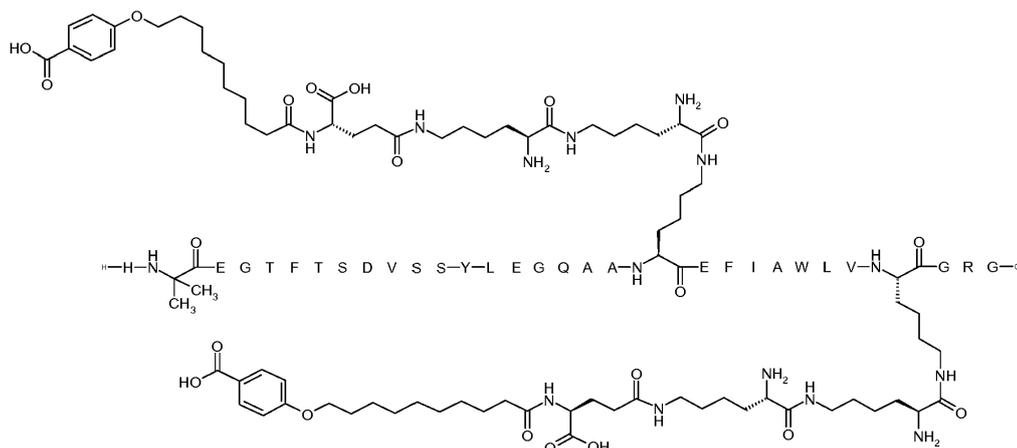
30 Los pesos moleculares se determinaron utilizando espectroscopía de masas de desorción e ionización láser asistida por la matriz de tiempo de vuelo registrada en un Microflex o Autoflex (Bruker). Se utilizó una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico.

B. Compuestos de ejemplo

Ejemplo 1

35 N^{ε26}-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{ε3a}-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 21:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

MALDI01v01: m/z calc.: 4721 m/z observada: 4720

Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 9.2 min

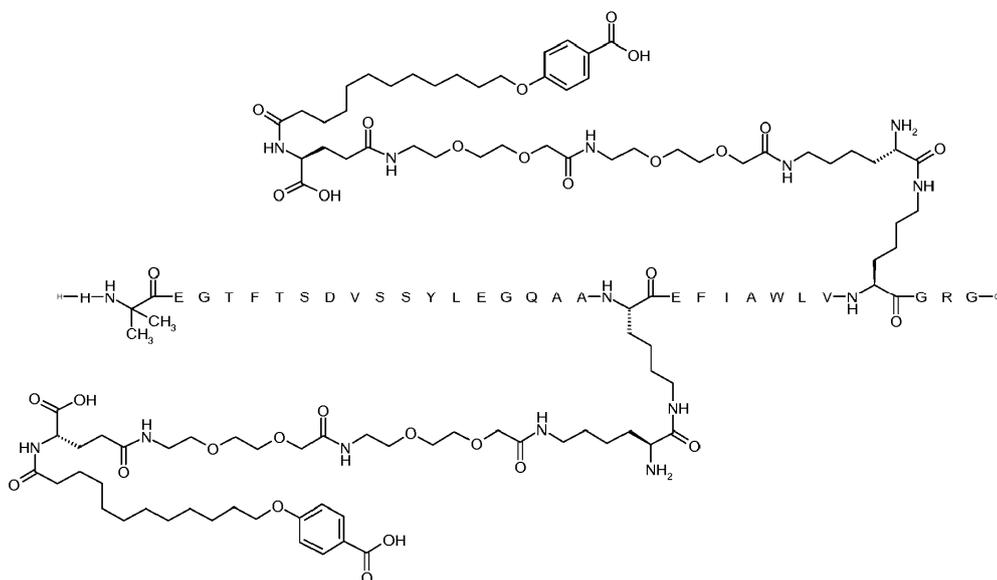
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7.8 min

5 Ejemplo 2

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

10

Quím. 22:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

MALDI01v01: m/z calc.: 5101.8 m/z observada: 5100.3

15 Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 12.9 min

Ejemplo 3

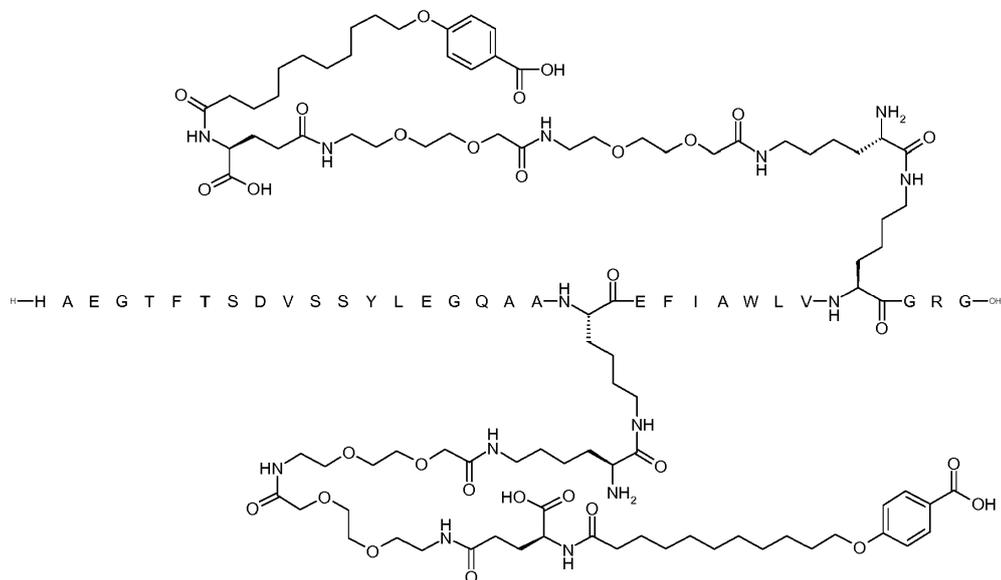
$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Imp⁷,Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

20

Quím. 23:

amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 25:



5

Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

MALDI01v01: m/z calc.: 5059.7 m/z observada: 5057.5

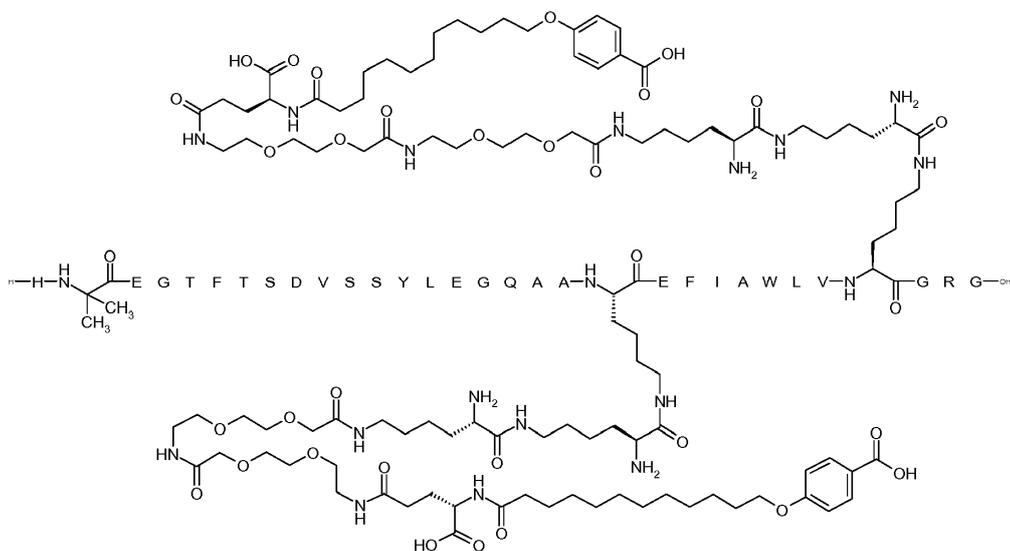
Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 11.1 min

Ejemplo 6

10 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

15

Quím. 26:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

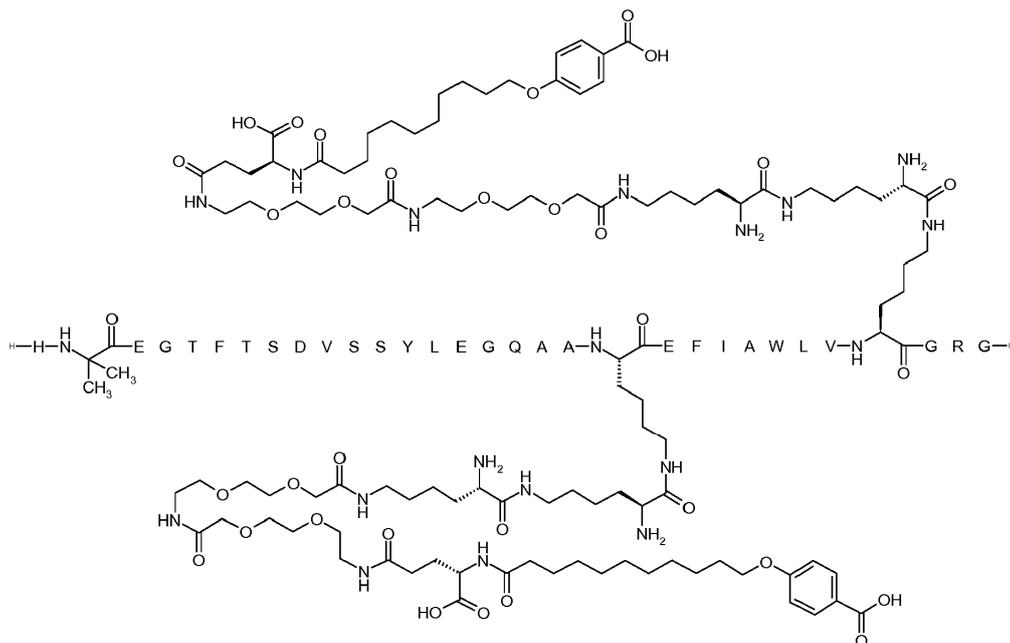
MALDI01v01: m/z calc.: 5358.2 m/z observada: 5356.2

Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 11.3 min

Ejemplo 7

5 N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 27:



10 Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

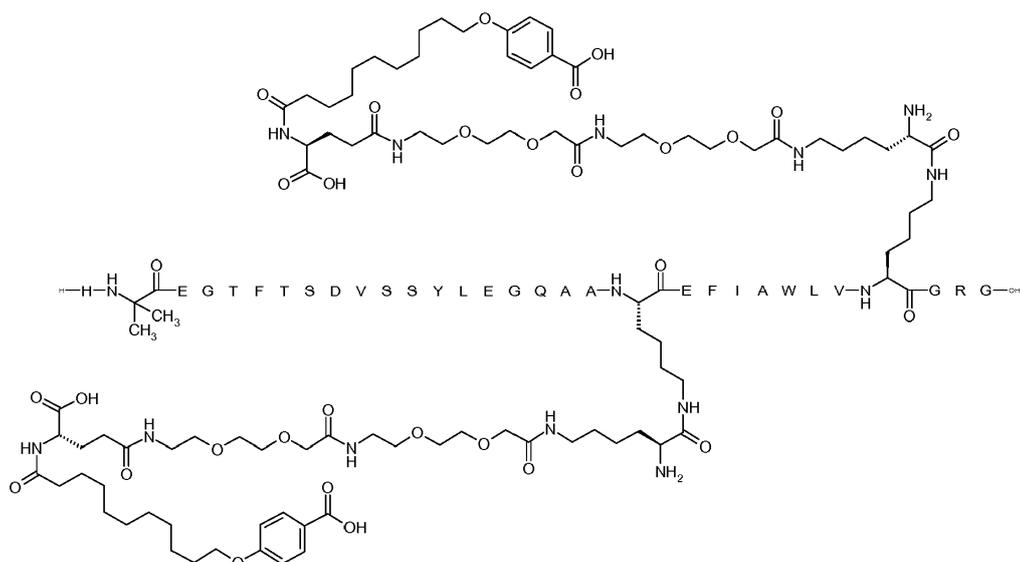
MALOI01v01: m/z calc.: 5330.1 m/z observada: 5328.8

Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 9.8 min

Ejemplo 8

15 N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 28:



Método de preparación: SPPS_P; SC_L; SC_M1; CP_M1

Método de LCMS LCMS01v01: m/z: observada m/3 1692, m/4 1269, m/5 1016; Rt = 2.17 min

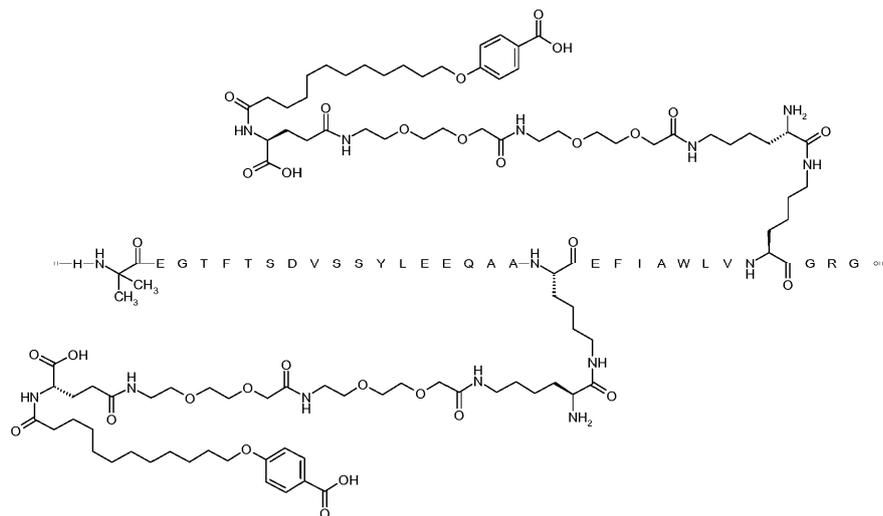
Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 11.5 min

5 Ejemplo 9

N^ε26-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], *N*^ε34-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸, Glu²²]-GLP-1-(7-37)-péptido

10

Quím. 29:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

MALDI01v01: m/z calc.: 5173.8 m/z observada: 5170.4

15

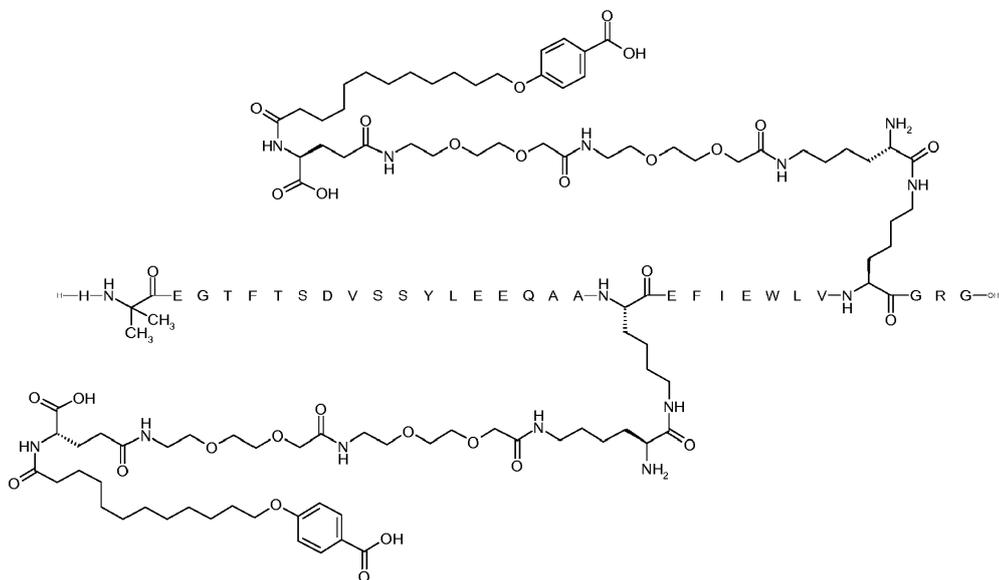
Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 12.9 min

Ejemplo 10

N^ε26-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], *N*^ε34-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-

carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-
[Aib⁸,Glu²²,Glu³⁰]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 30:



5 Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

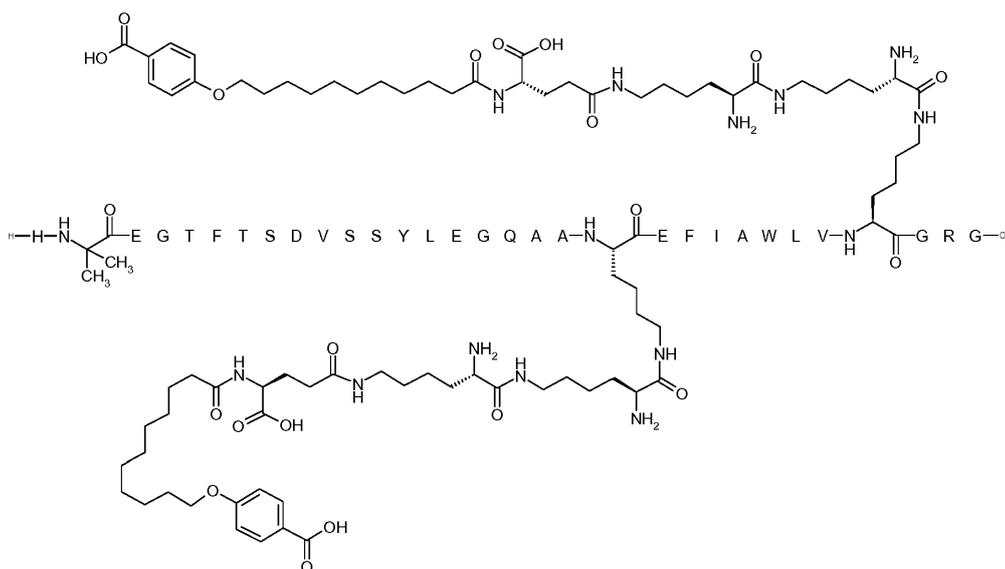
MALDI01v01: m/z calc.: 5231.9 m/z observada: 5230.5

Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 13.2 min

Ejemplo 11

10 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 31:



15 Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

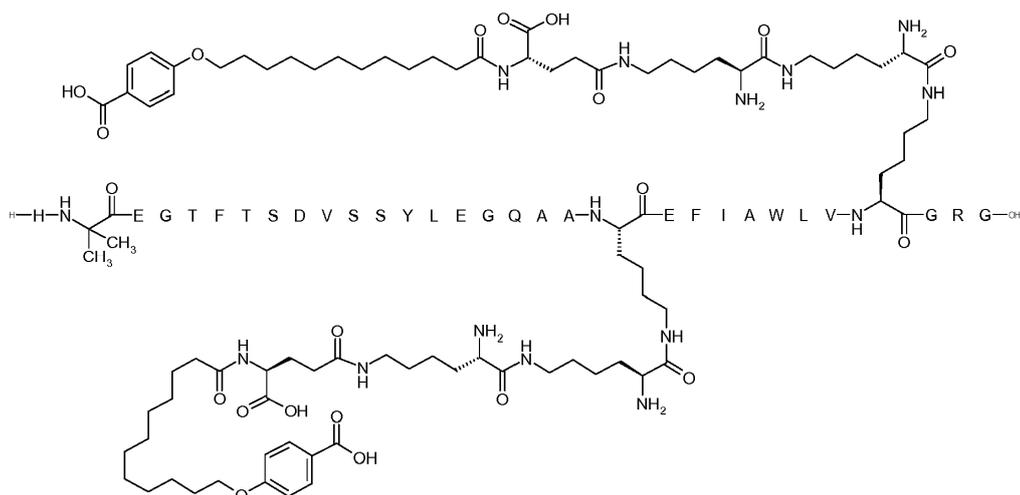
MALDI01v01: m/z calc.: 4749.5 m/z observada: 4749.6

UPLC07v01: Rt = 11.4 min

Ejemplo 12

5 N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1^{*}-(7-37)-péptido

Quím. 32:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

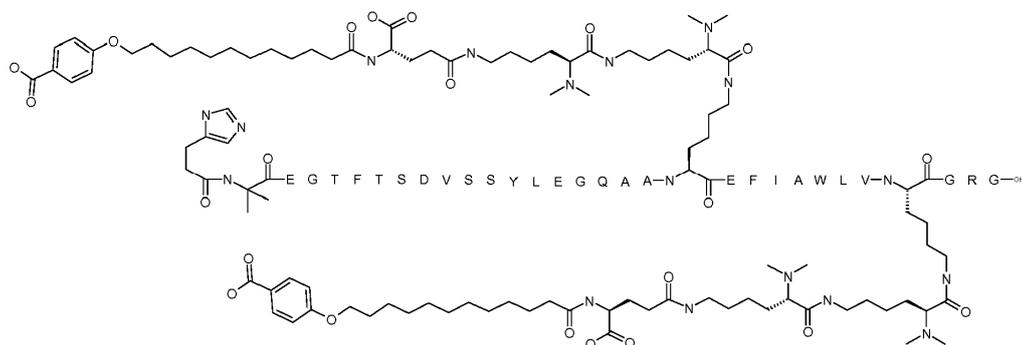
10 MALDI01v01: m/z calc.: 4777.4 m/z observada: 4777.5

Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 13.2 min

Ejemplo 13

15 N^{E26} -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil], N^{E34} -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]-[Imp⁷,Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

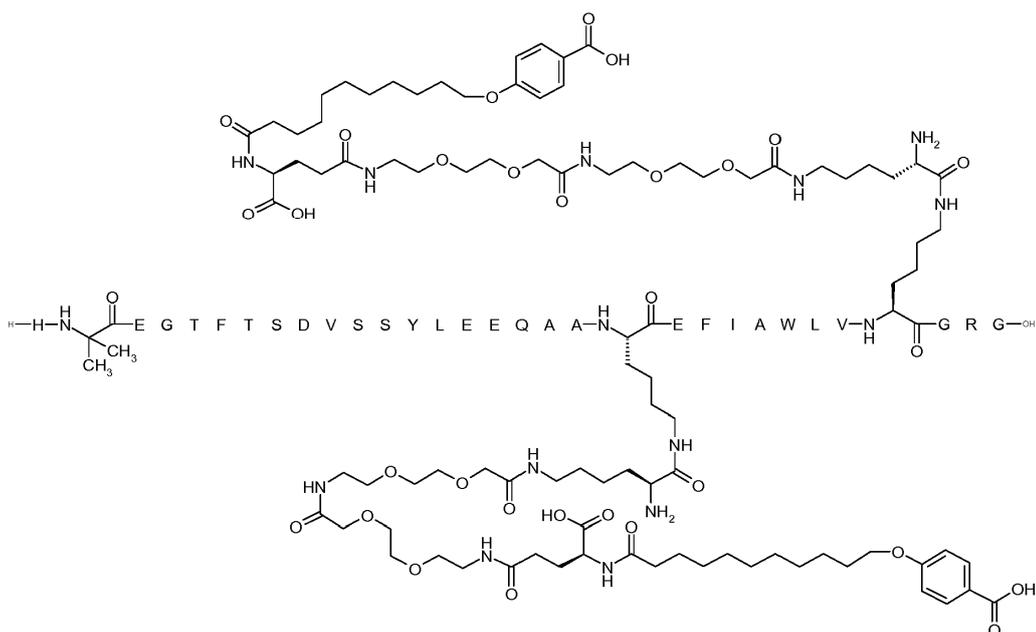
Quím. 33:



Método de preparación:

20 A una solución acuosa de AcOH 2 M que contenía un 10% de NMP (3 mL) del compuesto en el ejemplo 3 (14 500 nmol) se añadió formaldehído (25 µl, 37%). La mezcla se agitó durante 10 min y se añadió una solución del complejo de α-picolina-borano en NMP (150 µL). La mezcla se agitó durante 40 min. Después de una conversión completa, se elevó el pH hasta aproximadamente 11.5 con NaOH 1 M y se agitó durante 30 min. A continuación, se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N. La solución se diluyó con 45 mL de H₂O y se purificó mediante RP-HPLC estándar en una columna C18 de 5 µM utilizando acetonitrilo/agua/TFA. Las fracciones se analizaron mediante una combinación de métodos de UPLC, MALDI y LCMS y las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron.

25



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

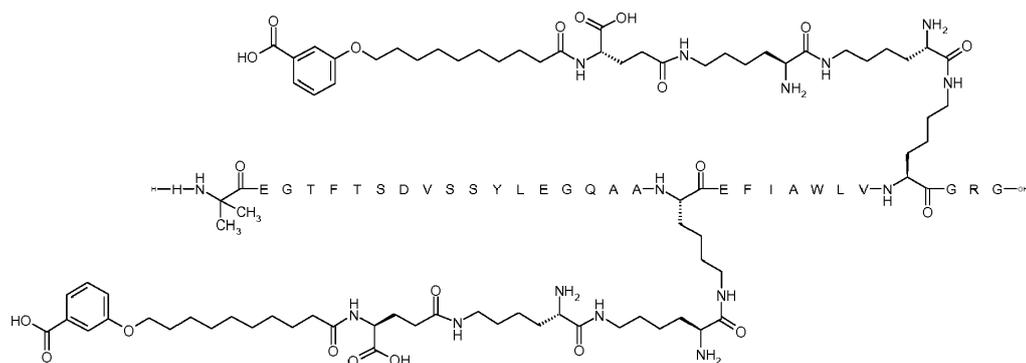
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8.6 min

MALDI01v1: m/z calc.:5145.8 m/z observada: 5146.6

5 Ejemplo 16

N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(3S)-4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 36:



10

Método de preparación: SPPS_P; SC_M2; CP_M1

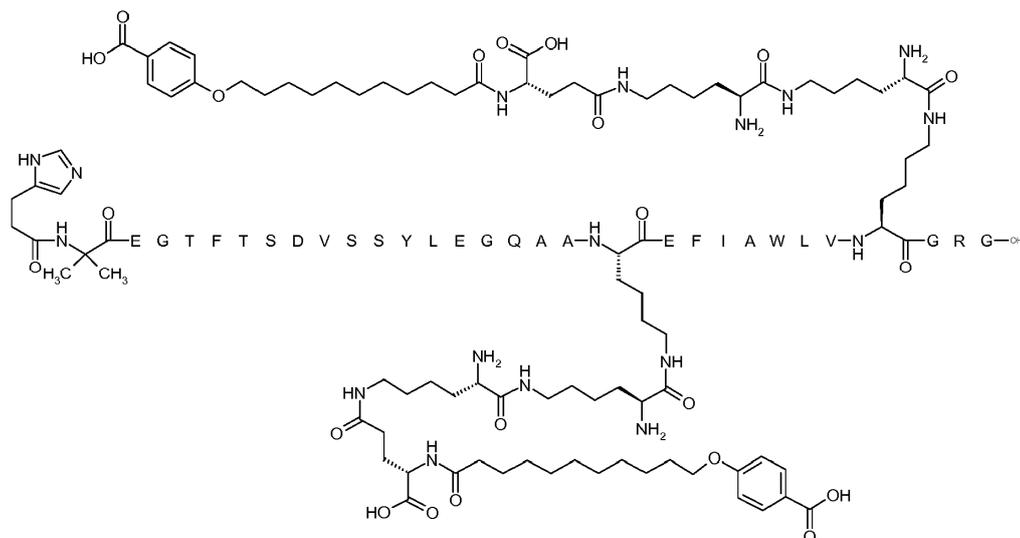
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8.2 min

LCMS01 v1: Rt = 1.7 min, m/z 1574 (m/3), 1181 (m/4), 945 (m/5), 788 (m/6)

Ejemplo 17

15 N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Imp⁷,Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 37:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

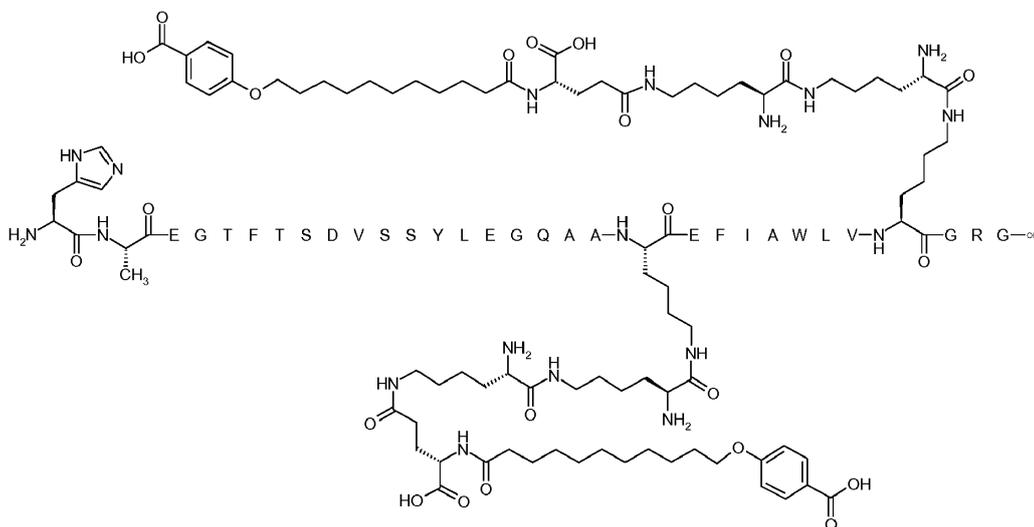
Método de UPLC: UPLC01v1: Rt = 12.56 min

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2.1 min, m/z 1578 (m/3), 1184 (m/4), 947 (m/5)

5 Ejemplo 18

N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-GLP-1-(7-37)-péptido

10 Quím. 38:



Método de preparación: SPPS_P; SC_P; CP_M1

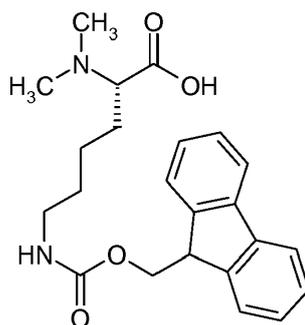
Método de UPLC: UPLC01v1, Rt = 12.08 min

Método de LCMS: LCMS01 v1: Rt = 2.0 min, m/z 1579 (m/3), 1185 (m/4), 948 (m/5)

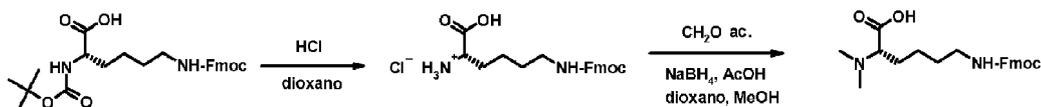
15 Ejemplo 19

Ácido (S)-2-dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)hexanoico

Quím. 39:



El compuesto de Quím. 39 se prepara de la siguiente manera (más detalles a continuación):



- 5 El material de partida, el ácido (*S*)-2-*tert*-butoxicarbonilamino-6-(9*H*-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico (Novabiochem F04-12-0069; 28.0 g, 59.8 mmol), se suspendió en 1,4-dioxano (800 mL), se añadió una solución de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (7.2 M, 500 mL) y la suspensión resultante se agitó a la temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se filtró y se lavó exhaustivamente con 1,4-dioxano y éter dietílico antes de secar al vacío. Se obtuvo el clorhidrato del ácido (*S*)-2-amino-6-(9*H*-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico como un sólido blanco.

Rendimiento: 23.58 g (96%)

RMN: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, MeOD- d_4 , $d\text{H}$): 7.80 (d, $J=7.4$ Hz, 2 H); 7.64 (d, $J=7.4$ Hz, 2 H); 7.47-7.25 (m, 4 H); 4.58-4.29 (m, 2 H); 4.14-4.25 (m, 1 H); 3.95 (t, $J=6.3$ Hz, 1 H); 3.19-2.73 (m, 2 H); 2.09-1.71 (m, 2 H); 1.65-1.14 (m, 4 H)

- 15 El producto de la reacción anterior (13.1 g, 32.4 mmol) y una solución acuosa de formaldehído (aprox. al 35%, 13.2 mL) se disolvieron en una mezcla de 1,4-dioxano/metanol (300 mL, 1:1) y la solución resultante se enfrió hasta 0 °C. A continuación, se añadió con cuidado borohidruro de sodio (5.50 g, 145 mmol) en tres porciones en 15 minutos y se ajustó el pH de la mezcla de reacción hasta pH 5.5 añadiendo ácido acético (14.4 mL). A continuación, se añadió una segunda porción de formaldehído acuoso (aprox. al 35%, 13.2 mL) a la mezcla de reacción y se añadió con cuidado otra parte de borohidruro de sodio (5.50 g, 145 mmol) en tres porciones. Se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos más. El análisis por HPLC-MS reveló una conversión total del material de partida, por lo tanto, se desactivó la reacción añadiendo una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 10% (aprox. 20 mL) hasta pH 7.0. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se extrajo con cloroformo (5 x 500 mL). Se recogieron las fracciones que contenían el producto deseado (TLC) y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. A continuación, la solución se filtró y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El producto crudo se disolvió en cloroformo caliente (300 mL) y se añadió una mezcla de éter dietílico/hexano (2:1, 700 mL). El precipitado formado se filtró, se lavó con éter dietílico antes de secar al vacío para obtener el compuesto del título como un polvo blanco.

Rendimiento: 14.26 g

- 30 LC-MS (Sunfire 4.6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua de 35:65 a 100:0 + 0.1% de FA): R_t = 3.71 min

LC-MS m/z : 397.4 (M+H) $^+$.

- El producto crudo recogido (36.5 g) de los 3 lotes anteriores se sometió a una cromatografía en columna RP (Cromasil C18, 100A, 13 μm , 7.5 x 41 cm, tasa de flujo 200 mL/min, acetonitrilo/agua de 20:80 a 45:55, detección UV 220 nm). Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron. Se obtuvo el ácido (*S*)-2-dimetilamino-6-(9*H*-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico como un polvo blanco fino.

Rendimiento: 20.21 g

RMN: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, AcOD- d_4 , $d\text{H}$): 7.87-7.72 (m, 2 H); 7.70-7.57 (m, 2 H); 7.53-7.20 (m, 4 H); 4.66-4.36 (m, 2 H); 4.35-4.12 (m, 1 H); 3.98-3.77 (m, 1 H); 3.32-3.10 (m, 2 H); 2.95 (s, 6 H); 2.16-1.73 (m, 2 H, superpuestos); 1.69-1.16 (m, 4 H)

- 40 LC-MS (Sunfire 4.6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua de 35:65 a 100:0 + 0.1% de FA): R_t = 3.11 min

LC-MS m/z: 397.2 (M+H)+

Este producto intermedio se puede utilizar en la síntesis del compuesto del Ejemplo 13 y otros compuestos con el mismo conector.

Métodos farmacológicos

5 Ejemplo 20: Potencia *in vitro* (AlphaScreen; membranas)

El objetivo de este ejemplo es estudiar la actividad, o potencia, de los derivados de GLP-1 *in vitro*.

Se determinó la potencia de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-3 tal como se describe a continuación, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contiene membranas que expresan el receptor de GLP-1 humano.

10 Principio

Se estimularon membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable, BHK467-12A (tk-ts13), que expresaban el receptor de GLP-1 humano, con el análogo o derivado de GLP-1 en cuestión, y se midió la potencia de la producción de cAMP utilizando el kit de ensayo cAMP AlphaScreen de Perkin Elmer Life Sciences. El principio básico del ensayo AlphaScreen es una competencia entre el cAMP endógeno y el biotina-cAMP añadido de manera exógena. Se logra la captura de cAMP utilizando un anticuerpo específico conjugado con microesferas aceptoras.

Cultivo celular y preparación de las membranas

Se seleccionaron una línea celular transfectada estable y un clon con expresión elevada para el cribado. Las células se cultivaron en un 5% de CO₂ en DMEM, 5% de FCS, 1% de Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) y 0.5 mg/mL del marcador de selección G418.

Se lavaron las células 2X con una confluencia de aproximadamente un 80% con PBS y se recolectaron con Versene (solución acuosa de la sal de tetrasodio del ácido etilendiaminotetraacético), se centri fugaron 5 min a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Todos los pasos adicionales se llevaron a cabo en hielo. El sedimento celular se homogeneizó con Ultrathurax 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 el Tampón 2, la homogeneización y la centrifugación se repitió una vez y las membranas se resuspendieron en el Tampón 2. Se determinó la concentración proteica y las membranas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar n.º de cat.: 3693). El volumen final por pocillo fue de 50 µL.

Soluciones y reactivos

Kit de ensayo cAMP AlphaScreen de Perkin Elmer Life Sciences (n.º de cat.: 6760625M); que contiene microesferas aceptoras Anti-cAMP (10 U/µL), microesferas donantes de estreptavidina (10 U/µL) y cAMP biotilado (133 U/µL).

35 Tampón AlphaScreen, pH=7.4: TRIS-HCl 50 mM (Sigma, n.º de cat.: T3253); HEPES 5 mM (Sigma, n.º de cat.: H3375); MgCl₂ · 6H₂O 10 mM (Merck, n.º de cat.: 5833); NaCl 150 mM (Sigma, n.º de cat.: S9625); 0.01% de Tween (Merck, n.º de cat.: 822184). Se añadieron los siguientes componentes al Tampón AlphaScreen antes de su uso (concentraciones finales indicadas): BSA (Sigma, n.º de cat.: A7906): 0.1%; IBMX (Sigma, n.º de cat.: I5879): 0.5 mM; ATP (Sigma, n.º de cat.: A7699): 1 mM; GTP (Sigma, n.º de cat.: G8877): 1 µM.

40 Patrón de cAMP (factor de dilución en el ensayo = 5): Solución de cAMP: 5 µL de una reserva de cAMP 5 mM + 495 µL de Tampón AlphaScreen.

Se preparó una serie de diluciones adecuadas en Tampón AlphaScreen del patrón de cAMP así como también del análogo o derivado de GLP-1 que se iba a estudiar, por ejemplo, las siguientes ocho concentraciones del compuesto de tipo GLP-1: 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹, 10⁻¹², 10⁻¹³ y 10⁻¹⁴M, y una serie de, por ejemplo, 10⁻⁶ a 3x10⁻¹¹ de cAMP.

45 Membrana/microesferas aceptoras

Se prepararon las membranas a partir de células hGLP-1/ BHK 467-12A con una concentración de 6 µg/pocillo correspondiente a 0.6 mg/mL (la cantidad de membranas utilizadas por pocillo puede variar) «Sin membranas»: Microesferas aceptó las (15 µg/mL) en tampón AlphaScreen

«6 µg/pocillo de membranas»: membranas + Microesferas aceptoras (15 µg/mL final) en tampón AlphaScreen.

Se añadió una alícuota (10 µL) de «Sin membranas» al patrón de cAMP (por pocillo en pocillos duplicados) y los controles positivos y negativos.

Se añadió una alícuota (10 µL) de «6 µg/pocillo de membranas» a GLP-1 y los análogos (por pocillo en pocillos duplicados o triplicados)

- 5 Control pos.: 10 µL de "sin membranas" + 10 µL de Tampón AlphaScreen
Control neg.: 10 µL de "sin membranas" + 10 µL de Solución de reserva de cAMP (50 µM)

Como las microesferas son sensibles a la luz directa, todas las manipulaciones se produjeron en la oscuridad (tan oscuro como fue posible) o con luz verde. Todas las ilusiones se realizaron en hielo.

Procedimiento

- 10 1. Preparar el Tampón AlphaScreen.
2. Disolver y diluir el GLP-1/Análogos/patrón de cAMP en Tampón AlphaScreen.
3. Preparar la Solución de microesferas donantes mezclando microesferas donantes de estreptavidina (2 unidades/pocillo) y cAMP biotinilado (1.2 unidades/pocillo) y e incubar 20-30 min en la oscuridad a la temperatura ambiente.
- 15 4. Añadir el cAMP/GLP-1/Análogos a la placa: 10 µL por pocillo.
5. Preparar la solución de membrana/Microesferas aceptoras y añadirla a las placas: 10 µL por pocillo.
6. Añadir las Microesferas donantes: 30 µL por pocillo.
7. Envolver la placa en papel aluminio e incubar en el agitador durante 3 horas (muy despacio) a RT.
8. Contar en el AlphaScreen, cada placa se preincuba en el AlphaScreen durante 3 minutos antes de contar.

20 Resultados

Se calcularon los valores de EC₅₀ [pM] utilizando el software Graph-Pad Prism (versión 5) y se muestran a continuación en la Tabla 1. Se confirmó la potencia de todos los derivados *in vitro*.

Tabla 1: Potencia *in vitro* (AlphaScreen; membranas)

Compuesto de Ejemplo n.º	EC ₅₀ /pM
1	77
2	205
3	295

25 Todos los derivados excepto dos presentaron una buena potencia *in vitro* que corresponde a una EC₅₀ inferior a 1200 pM.

A efectos de comparación, el compuesto n.º 13 en la Tabla 1 de *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-diácido-C12) presentó una potencia *in vitro* correspondiente a una EC₅₀ de 1200 pM.

Ejemplo 21: Potencia *in vitro* (CRE luciferasa; células enteras)

30 El objetivo de este ejemplo es estudiar la actividad, o potencia, de los derivados de GLP-1 *in vitro*. La potencia *in vitro* es la medida de la activación del receptor de GLP-1 humano en un ensayo con células enteras.

Se determinó la potencia de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 3-18 tal como se describe a continuación. Se incluyó la semaglutida a efectos de comparación.

Principio

35 Se determinó la potencia *in vitro* midiendo la respuesta del receptor de GLP-1 humano en un ensayo con un gen indicador. El ensayo se llevó a cabo en una línea celular BHK transfectada de manera estable que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta a cAMP (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). La activación del receptor de GLP-1 humano conlleva la producción de cAMP que a su vez conlleva la expresión de la proteína luciferasa. Cuando la incubación del ensayo

finalizó, se añadió el sustrato de la luciferasa (luciferina) y la enzima convirtió la luciferina en oxiluciferina y produjo bioluminiscencia. Se midió la luminiscencia y fue la lectura del ensayo.

5 Con el fin de estudiar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se llevó a cabo en ausencia de albúmina sérica así como también en presencia de una concentración considerablemente elevada de albúmina sérica (concentración final en el ensayo de un 1.0%). Un aumento de la potencia *in vitro*, valor de EC₅₀, en presencia de albúmina sérica indica una afinidad por la albúmina sérica y representa un método para predecir un perfil farmacocinético prolongado de la sustancia de prueba en los modelos en animales.

Cultivo celular y preparación

10 Las células utilizadas en este ensayo (clon FCW467-12A/KZ10-1) fueron células BHK con BHKTS13 como línea celular progenitora. Las células se derivaron de un clon (FCW467-12A) que expresa el receptor de GLP-1 humano y se establecieron mediante una transfección adicional con CRE luciferasa para obtener el presente clon.

15 Las células se cultivaron en un 5% de CO₂ en medio de cultivo celular. Se obtuvieron alícuotas y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes de cada ensayo, se tomó una alícuota y se lavó dos veces en PBS antes de suspenderla para obtener la concentración deseada en el tampón de ensayo específico. Para las placas de 96 pocillos se llevó a cabo la suspensión para obtener una concentración final de 5x10³ células/pocillo.

Materiales

En el ensayo se utilizaron los siguientes compuestos químicos: Pluronic F-68 (10%) (Gibco 2404), albúmina sérica humana (HSA) (Sigma A9511), ovalbúmina (Sigma A5503), DMEM sin rojo de fenol (Gibco 11880-028), Hepes 1 M (Gibco 15630), Glutamax 100x (Gibco 35050) y steadylite plus (PerkinElmer 6016757).

Tampones

20 El medio de cultivo celular estuvo constituido por un 10% de FBS (suero bovino fetal), 1 mg/mL de G418, MTX (metotrexato) 240 nM y 1% de pen/estrep (penicilina/estreptomicina). El medio de ensayo estuvo constituido por DMEM sin rojo de fenol, Hepes 10 mM y 1x Glutamax. El tampón de ensayo al 1% estuvo constituido por un 2% de ovalbúmina, un 0.2% de Pluronic F-68 y un 2% de HSA en medio de ensayo. El tampón de ensayo al 0% estuvo constituido por un 2% de ovalbúmina y un 0.2% de Pluronic F-68 en medio de ensayo.

Procedimiento

- 1) Las reservas de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C.
- 2) Las células se lavaron tres veces en PBS.
- 30 3) Las células se contaron y se ajustó la concentración hasta un valor de 5x10³ células/50 µL (1x10⁵ células/mL) en medio de ensayo. Se transfirió una alícuota de 50 µL de células a cada pocillo de la placa de ensayo.
- 4) Se diluyeron las reservas de los compuestos de prueba y compuestos de referencia hasta una concentración de 0.2 µM en el tampón de ensayo 0% para el ensayo de CRE luciferasa con un 0% de HSA y en tampón de ensayo al 1% para el ensayo de CRE luciferasa con HSA. Los compuestos se diluyeron 10 veces para obtener las siguientes concentraciones: 2x10⁻⁷ M, 2x10⁻⁸ M; 2x10⁻⁹ M, 2x10⁻¹⁰ M, 2x10⁻¹¹ M, 2x10⁻¹² M y 2x10⁻¹³ M. Para cada compuesto también se incluyó un control con un blanco de tampón de ensayo.
- 35 5) Se transfirió una alícuota de 50 µL del compuesto o blanco por triplicado de la placa de dilución a la placa de ensayo. Se estudiaron los compuestos con las siguientes concentraciones finales: 1x10⁻⁷ M, 1x10⁻⁸ M; 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹⁰ M, 1x10⁻¹¹ M, 1x10⁻¹² M y 1x10⁻¹³ M.
- 40 6) La placa de ensayo se incubó durante 3 h en un incubador con un 5% de CO₂ a 37°C.
- 7) La placa de ensayo se retiró del incubador y se permitió que estuviera a la temperatura ambiente durante 15 min.
- 8) Se añadió una alícuota de 100 µL del reactivo steadylite plus a cada pocillo de la placa de ensayo (el reactivo era sensible a la luz).
- 45 9) Se cubrió cada placa de ensayo con papel de aluminio para protegerla de la luz y se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente.
- 10) Se leyó cada placa de ensayo en un instrumento TopCount NXT de Packard.

Cálculos y resultados

Se transfirieron los datos desde el instrumento TopCount hasta el software GraphPad Prism. El software promedia los valores para cada réplica y realiza una regresión no lineal. Se calcularon los valores de EC₅₀ con el software y se muestran a continuación en la Tabla 2 (en pM).

Tabla 2: Potencia *in vitro* (CRE luciferasa)

Compuesto de Ejemplo n.º	EC ₅₀ /pM (0% de HSA)	EC ₅₀ /pM (1% de HSA)	EC ₅₀ /pM (relación entre 1% de HSA/0% de HSA)
1	6.4	236	37
2	10	827	82
3	146	158	1.1
4	34	320	9.4
5	52	165	3.2
6	17	102	6.0
7	36	68	1.9
8	25	78	3.2
9	5.7	136	24
10	8.7	251	29
11	4.3	47	11
12	5.4	99	18
13	30	367	12
14	13	1263	108
15	7.0	683	96
16	16	56	3.5
17	16	379	24
18	8.7	296	34

5 Todos los derivados presentaron una buena potencia *in vitro* que corresponde a una EC₅₀ con 0% de HSA inferior a 200 pM.

10 A efectos de comparación, el compuesto n.º 13 en la Tabla 1 de *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-diácido-C12) presentó una potencia *in vitro* correspondiente a una EC₅₀ con un 0% de HSA de 440 pM, una EC₅₀ con un 1% de HSA de 3317 pM, y una relación (1% de HSA / 0% de HSA) de 7.5.

Ejemplo 22: Unión al receptor de GLP-1

El objetivo de este experimento es estudiar la unión del receptor de GLP-1 a los derivados de GLP-1 y cómo la unión está potencialmente influenciada por la presencia de la albúmina. Esto se realiza en un experimento *in vitro* tal como se describe a continuación.

15 Se midió la afinidad de unión de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-18 al receptor de GLP-1 humano en función de su capacidad de desplazar ¹²⁵I-GLP-1 del receptor. Con el fin de estudiar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se llevó a cabo con una concentración baja de albúmina (aproximadamente de un 0.001%, correspondiente a su cantidad residual en el trazador), así como también con una concentración elevada de albúmina (2.0% añadido). Un desplazamiento en la afinidad de unión, IC₅₀, indica que el péptido en cuestión se une a la albúmina y, por lo tanto, predice un potencial perfil farmacocinético prolongado del péptido en cuestión en los modelos en animales.

Condiciones

Especie (*in vitro*): Hámster

Criterio de valoración biológico: Unión al receptor

Método de ensayo: SPA

Receptor: Receptor de GLP-1

Línea celular: BHK tk-ts13

5 Cultivo celular y purificación de las membranas

Se seleccionaron una línea celular transfectada estable y un clon con expresión elevada para el cribado. Las células se cultivaron en un 5% de CO₂ en DMEM, 10% de FCS, 1% de Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) y 1.0 mg/mL del marcador de selección G418.

10 Se lavaron las células (aprox. un 80% de confluencia) dos veces en PBS y se recolectaron con Versene (solución acuosa de la sal de tetrasodio del ácido etilendiaminotetraacético), tras lo cual se separaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Las células/sedimento celular se deben mantener en hielo en la medida de lo posible en las siguientes etapas. El sedimento celular se homogeneizó con Ultrathurrax durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada de Tampón 1 (que depende de la cantidad de células pero, por ejemplo, 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. Esta etapa se repitió una vez más. El sedimento resultante se resuspendió en el Tampón 2 y se determinó la concentración proteica. Las membranas se almacenaron a -80 °C.

Tampón 1: Na-HEPES 20 mM + EDTA 10 mM, pH 7.4

Tampón 2: Na-HEPES 20 mM + EDTA 0,1 mM, pH 7.4

Ensayo de unión:

20 SPA:

Los compuestos de prueba, membranas, partículas SPA y [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)NH₂ se diluyeron en tampón de ensayo. Se añadieron 50 µL (microlitros) de HSA (del experimento con «mucho albúmina» que contenían un 2% de HSA) o tampón (del experimento con «poca albúmina» que contenía un 0.001% de HSA) a Optiplate y se añadieron 25 µL de los compuestos de prueba. Se añadieron 5-10 µg de proteína de membrana/muestra (50 µL) correspondientes a 0.1-0.2 mg de proteína/mL (preferentemente, se optimiza para cada preparación de membranas). Se añadieron las partículas SPA (microesferas SPA con aglutinina de germen de trigo, Perkin Elmer, #RPNQ0001) en una cantidad de 0.5 mg/pocillo (50 µL). La incubación se hizo comenzar con [¹²⁵I]-GLP-1-(7-36)NH₂ (concentración final de 0.06 nM correspondiente a 49.880 DPM, 25 µL). Las placas se sellaron con PlateSealer y se incubaron durante 120 minutos a 30 °C con agitación. Las placas se centrifugaron (1500 rpm, 10 min) y se contaron con Topcounter.

30 Tampón de ensayo:

HEPES 50 mM

EGTA 5 mM

MgCl₂ 5 mM

0.005% de Tween

35 pH 7.4

la HSA fue SIGMA A1653

Cálculos

Se leyó el valor de IC₅₀ a partir de la curva como la concentración con la que se desplaza un 50% de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.

40 Por lo general, la unión al receptor de GLP-1 con una concentración baja de albúmina debe ser tan buena como sea posible (buena potencia), lo que corresponde a un valor de IC₅₀ bajo.

45 El valor de IC₅₀ con una concentración elevada de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Tal y como se sabe, los derivados de GLP-1 también se unen a la albúmina. Por lo general, este es un efecto deseable, que prolonga su presencia en el plasma. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ con una concentración elevada de albúmina será, por lo general, más elevado que el valor de IC₅₀ con una concentración baja de albúmina, lo que corresponde a una reducción de la unión al receptor de GLP-1 provocada por la unión de la albúmina que compite por la unión al receptor de GLP-1.

Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3: Afinidad de unión al receptor

Compuesto de Ejemplo n.º	IC ₅₀ /nM (poca HSA)	IC ₅₀ /nM (muchas HSA)
1	0.52	21
2	0.73	448
3	0.82	218
4	0.93	264
5	2.35	244
6	1.02	163
7	1.37	89
8	2.08	295
9	0.84	≥1000
10	1.36	≥1000
11	0.49	68
12	0.26	150
13	1.63	958
14	2.01	618
15	1.13	329
16	0.63	53
17	11.1	≥1000
18	0.04	35

- 5 Todos los derivados presentaron una IC₅₀ (poca albúmina) inferior a 12.0 nM. En lo que se refiere a la IC₅₀ (muchas albúmina), todos los derivados menos tres presentaron una IC₅₀ (muchas albúmina) inferior a 1000 nM.

A efectos de comparación, el compuesto n.º 13 en la Tabla 1 de *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-diácido-C12) presentó una IC₅₀ (poca albúmina) de 17.7 nM, y una IC₅₀ (muchas albúmina) de 908 nM.

Ejemplo 23: Estudio farmacocinético (PK) en minicerdos

- 10 El objetivo de este estudio es determinar la prolongación *in vivo* de los derivados de GLP-1 después de la administración i.v. a minicerdos, es decir, la prolongación del tiempo de acción. Esto se realiza en un estudio farmacocinético (PK) donde se determina la semivida de eliminación del derivado en cuestión. La semivida de eliminación se refiere por lo general al periodo de tiempo necesario para reducir a la mitad una cierta concentración plasmática, medida después de la fase de distribución inicial.
- 15 Los derivados de los Ejemplos 3 y 6 se sometieron al estudio PK A (véase más adelante), mientras que los derivados de los Ejemplos 2 y 13 se sometieron al estudio PK B (véase más adelante).

- 20 Estudio A: Para los estudios se utilizaron minicerdos macho Göttingen obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmoose, Dinamarca) con una edad de aproximadamente 7-14 meses y un peso de aproximadamente 16-35 kg. A los minicerdos se les alojó de manera individual y se restringió la alimentación a una o dos veces al día con dieta para cerdos SDS (Special Diets Services, Essex, UK). Después de al menos 2 semanas de aclimatación se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudal o craneal en cada animal. Se concedió 1 semana de recuperación a los animales después de la cirugía y a continuación, se utilizaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un periodo de reposo farmacológico adecuado entre las sucesivas administraciones de dosis del derivado de GLP-1.

Se privó a los animales de alimentos durante aproximadamente 18 h antes de la administración de la dosis y entre 0 y 4 h después de la administración de la dosis pero durante todo el periodo tuvieron acceso al agua sin restricciones.

Los derivados de GLP-1 se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4, hasta por lo general una concentración de 20-60 nmol/mL. Se administraron inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a normalmente 1-2 nmol/kg, por ejemplo, 0.033ml/kg) de los compuestos a través de un catéter, y se obtuvieron muestras de sangre en puntos temporales predefinidos durante hasta 13 días después de la administración de las dosis (preferentemente, a través del otro catéter). Se recogieron las muestras de sangre (por ejemplo, 0.8 mL) en tampón EDTA (8 mM) y a continuación, se centrifugaron a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos.

Estudio B: Para los estudios se utilizaron minicerdos macho Göttingen obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmoose, Dinamarca) con una edad de aproximadamente 5 meses y un peso de aproximadamente 9 kg. A los minicerdos se les alojó en jaulas con lechos de paja, en cada jaula se juntaron seis y se restringió la alimentación a una o dos veces al día con dieta para minicerdos Altromin 9023 (Chr. Petersen A/S, DK-4100 Ringsted). Se utilizaron los cerdos para estudios farmacocinéticos repetidos con un periodo de reposo farmacológico adecuado entre las sucesivas administraciones de dosis del derivado de GLP-1. Se concedió un periodo de aclimatación de 1 semana durante el cual se entrenó a los minicerdos para que se apoyaran sobre la espalda para la obtención de muestras de sangre y en una eslinga para la administración i.v. de dosis. La manipulación, administración de dosis y obtención de muestras sanguíneas de los animales en su totalidad las realizará personal formado y experto.

Se privó a los animales de alimentos durante aproximadamente 18 h antes de la administración de la dosis y entre 0 y 4 h después de la administración de la dosis pero durante todo el periodo tuvieron acceso al agua sin restricciones.

Los derivados de GLP-1 se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4, hasta por lo general una concentración de 20-60 nmol/mL. Se administraron las inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a normalmente 2 nmol/kg, por ejemplo, 0.1 mL/kg) de los compuestos en forma de inyecciones intravenosas mediante Venflon insertado en una vena de la oreja mientras se colocaban sin anestesiarse en una eslinga. El volumen de la dosis fue de 0.1 mL/kg y se obtuvieron muestras de sangre en puntos temporales predefinidos durante hasta 17 días después de la administración de las dosis (las muestras se extrajeron con una jeringuilla a partir de la vena yugular). Se recogieron las muestras de sangre (por ejemplo, 0.8 mL) en tampón EDTA (8 mM) y a continuación, se centrifugaron a 4 °C y 2000 G durante 10 minutos.

Obtención de muestras y análisis (estudio A y B): Se pipeteó el plasma en tubos Micronic en hielo seco y se mantuvo a -20 °C hasta que se analizaron para determinar la concentración en plasma del respectivo compuesto de tipo GLP-1 utilizando Elisa o un ensayo similar con anticuerpos o LC-MS. Se analizaron los perfiles individuales de concentración en plasma-tiempo con un modelo no compartimentalizado en Phoenix WinNonLin ver. 6.2. (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE. UU.) y se determinaron las semividas de eliminación (media armónica) resultantes.

Resultados

Se estudiaron los compuestos de los Ejemplos 2, 3, 6 y 13 y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Semivida en minicerdos

Compuesto de Ejemplo n.º	PK iv en minicerdos, T½ (horas)
2	68
3	66
6	93
13	79

Todos los compuestos estudiados tuvieron una semivida muy buena, muy por encima de las 50 horas.

A efectos de comparación, el compuesto n.º 13 en la Tabla 1 de *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-diácido-C12) presentó una semivida de 5 horas.

Ejemplo 24: Estudio farmacocinético (PK) en ratas

El objetivo de este Ejemplo es estudiar la semivida *in vivo* en ratas.

Se realizaron estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas con los derivados de GLP-1 de varios de los Compuestos de ejemplo, tal como se describe a continuación. Se incluyó la semaglutida a efectos de comparación.

Se obtuvieron ratas macho Sprague Dawley de la misma edad con un peso corporal de aproximadamente 400 g de Taconic (Dinamarca) y se les asignó el tratamiento mediante una simple aleatorización según el peso corporal, de manera aproximada 4 ratas por grupo.

5 Los derivados de GLP-1 (aproximadamente 6 nmol/mL) se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4. Se administraron inyecciones intravenosas (1.0 mL/kg) de los compuestos con una jeringuilla en la vena de la cola de ratas conscientes. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena sublingual durante 5 días después de administrar la dosis. Se recogieron las muestras de sangre (200 µL) en tampón EDTA (8 mM) y a continuación, se centrifugaron a 4 °C y 10 000 G durante 5 minutos. Las muestras de plasma se mantuvieron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar la concentración en plasma del respectivo compuesto de tipo GLP-1.

10 Se determinó la concentración en plasma de los compuestos de tipo GLP-1 utilizando un Inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI), en términos generales según lo describen para la determinación de la insulina Poulsen y Jensen en *Journal of Biomolecular Screening* 2007, vol. 12, págs. 240-247. Las microesferas donantes se recubrieron con estreptavidina, mientras que las microesferasceptoras se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo central/C-terminal del péptido. Se biotiniló otro anticuerpo monoclonal, específico para el extremo N. Se combinaron los tres reactivos con el analito y formaron un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberó átomos de oxígeno singlete de las microesferas donantes que fueron canalizados en las microesferas receptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz fue proporcional a la concentración del compuesto.

20 Se analizaron los perfiles de concentración en plasma-tiempo utilizando Phoenix WinNonLin ver. 6.2, Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE. UU.) y se calculó la semivida ($T_{1/2}$) utilizando los perfiles individuales de concentración en plasma-tiempo de cada animal.

Resultados

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 5.

25 Tabla 5: Semivida en ratas

Compuesto de Ejemplo n.º	PK en ratas $T_{1/2}$ (horas)
1	13
2	17
8	14
11	10

Todos los compuestos estudiados tuvieron una semivida de 10 horas o más. La semivida de la semaglutida estudiada en la misma configuración pero con n=8 fue de 11 horas.

Ejemplo 25: Estudio fármacodinámico (PD) en cerdos

30 El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de un par de Compuestos de ejemplo en la ingesta de alimentos en cerdos. Esto se realizó en un estudio farmacodinámico (PD) tal como se describe a continuación, en el cual se midió la ingesta de alimentos de 1 a 4 días después de la administración de una única dosis del derivado de GLP-1, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo.

35 Se utilizaron cerdos hembra Landrace Yorkshire Duroc (LYD) con una edad de aproximadamente 3 meses que pesaban aproximadamente 30-35 kg (n=3-4 por grupo). Se alojó a los animales en un grupo durante aproximadamente 1 semana durante la aclimatación a las instalaciones para los animales. Durante el periodo experimental, se colocó a los animales en jaulas individuales al menos 2 días antes de la administración de la dosis y durante la totalidad del experimento para medir la ingesta individual de alimentos. Se alimentó a los animales sin restricciones con forraje para cerdos (Svinefoder Danish Top) en todo momento tanto durante el periodo de aclimatación como el experimental. Se monitorizó la ingesta de alimentos de manera informática registrando el peso de forraje cada 15 minutos. El sistema utilizado fue Mpigwin (Ellegaard Systems, Faaborg, Dinamarca).

40 Se disolvieron los derivados de GLP-1 en un tampón de fosfato (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, 0.05% de tween 80, pH 7.4) con concentraciones de 12, 40, 120, 400 o 1200 nmol/ml que corresponden a dosis de 0.3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg. El tampón de fosfato actúa como vehículo. A los animales se les administró una única dosis subcutánea del derivado de GLP-1 o el vehículo (volumen de la dosis de 0.025 mL/kg) la mañana del día 1 y se midió la ingesta de alimentos durante 1 día después de administrar la dosis. En el último día de cada estudio, 1-4 días después de la administración de la dosis, se obtuvo una muestra de sangre del corazón de animales anestesiados para medir la exposición plasmática del derivado de GLP-1. Posteriormente se sacrificó a los animales

con una sobredosis intracardiaca de pentobarbitona. Se analizaron los contenidos en plasma del derivado de GLP-1 utilizando ELISA o un ensayo similar con anticuerpos o LC-MS.

5 Se calculó la ingesta de alimentos como la media \pm SEM de la ingesta de alimentos en intervalos de 24 h (0-24 h, 24-48 h y 48-72 h). En la siguiente Tabla 6, se indica la ingesta de alimentos como el porcentaje de la ingesta de alimentos del grupo del vehículo en el mismo intervalo de tiempo (dosificación de 3.0 nmol/kg).

Se realizaron las comparaciones estadísticas de la ingesta de alimentos en los intervalos de 24 horas en el grupo del vehículo frente al grupo del derivado de GLP-1 utilizando medidas repetidas de ANOVA bidireccional, seguido por la prueba *post hoc* de Bonferroni.

Resultados

10 Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6: Efecto de la ingesta de alimentos en cerdos

Compuestos de Ejemplo n.º/Intervalo de tiempo (h)	PD en cerdos, ingesta de alimentos (% de vehículo) durante las horas (x-y)		
	0-24	24-48	48-72
2	58	73	-
8	50	94	-

Los compuestos estudiados mostraron una buena reducción de la ingesta de alimentos.

15 A efectos de comparación, cuando se estudió de la misma manera, el compuesto n.º 13 en la Tabla 1 de *Journal of Medicinal Chemistry* (2000), vol. 43, n.º 9, págs. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-diácido-C12) presentó una ingesta de alimentos (% del vehículo) durante las horas 0-24, 24-48 y 48-72, de un 95%, 96% y un 103%, respectivamente.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados de GLP-1 doblemente acilados

20 <130> 8499.204-WO

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 31

25 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> péptido_mad

< 222> (1)..(31)

30 <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 péptido GLP-1,

donde el péptido comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 34 de GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1) y ocho cambios de aminoácidos como máximo en comparación con GLP-1 (7-37),

donde el derivado comprende dos restos de prolongación unidos a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, donde

el resto de prolongación es Quím. 2:



en el cual y es un número entero en el intervalo de 6-13; y

el conector comprende

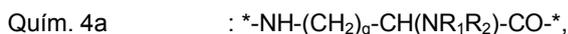


donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R₁ y R₂ representan de manera independiente *-H o *-CH₃ y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. El derivado de la reivindicación 1, donde w es 0.

3. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde Quím. 3a se representa mediante



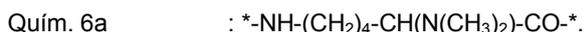
donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

4. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde q es 4.

5. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde Quím. 3a o Quím. 4a, respectivamente, se representa mediante



6. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde Quím. 3a o Quím. 4a, respectivamente, se representa mediante



7. El derivado de cualquiera de las realizaciones 1-6, donde Quím. 3a, Quím. 4a, Quím. 6a o Quím. 6, respectivamente, está conectado en su extremo CO-* al grupo épsilon-amino del primer o el segundo residuo de K del péptido GLP-1.

8. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde y es 9, 10 u 11.

9. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el péptido GLP-1 presenta como máximo tres cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO:1).

10. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el péptido GLP-1 es un péptido de Fórmula I:



donde

Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo (Imp), α-hidroxihistidina, D-histidina, desaminohistidina (desH), 2-aminohistidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, N^α-acetilhistidina, N^α-formilhistidina, α-fluorometilhistidina, α-metilhistidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, (1-aminociclohexil)carboxílico, (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;

Xaa₁₂ es Phe o Leu;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Val o Leu;

Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu o Met;

5 Xaa₂₂ es Gly, Glu o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu o Arg;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₇ es Glu o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

10 Xaa₃₁ es Trp o His

Xaa₃₃ es Val;

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

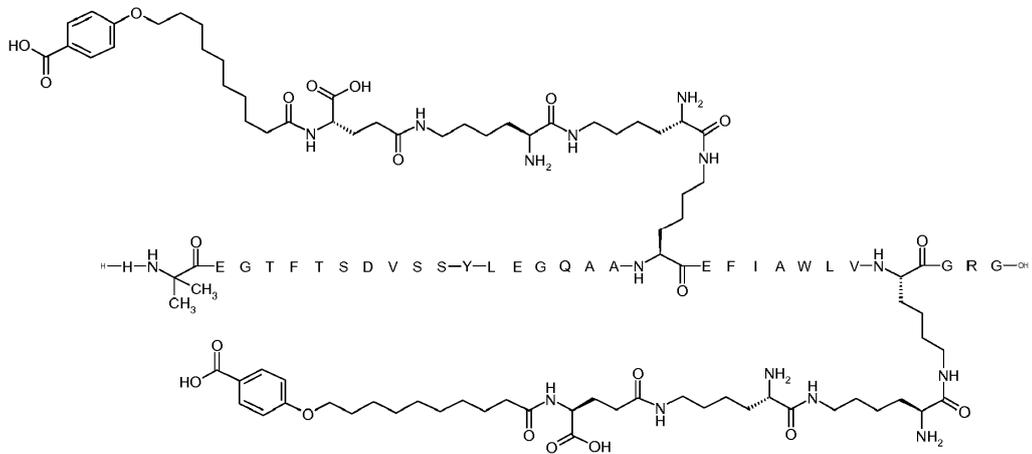
Xaa₃₆ es Arg o Gly;

Xaa₃₇ es Gly o Arg; y

15 Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg o está ausente.

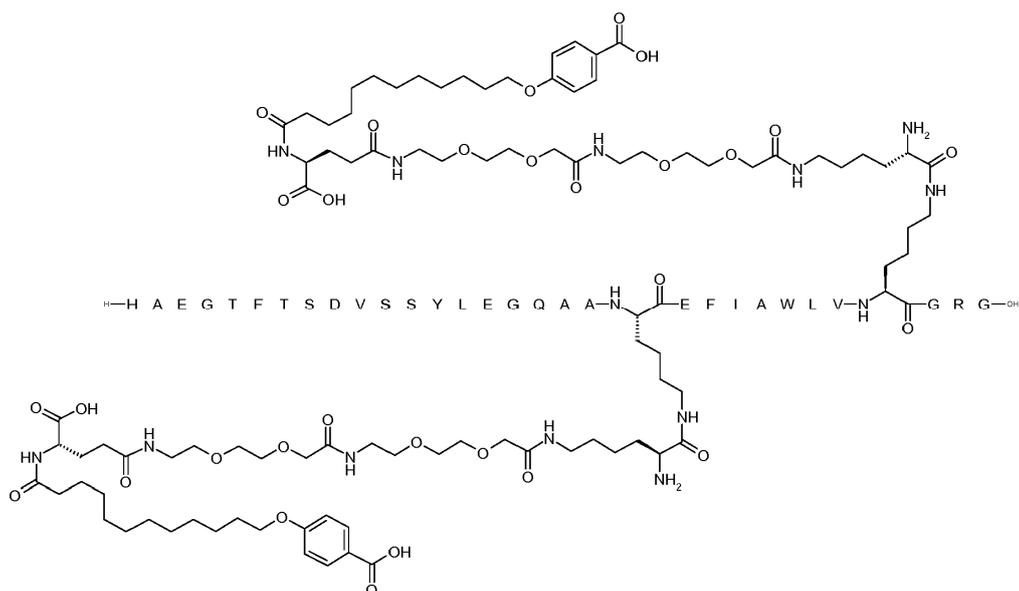
11. Un compuesto seleccionado entre los siguientes:

Quím. 21:



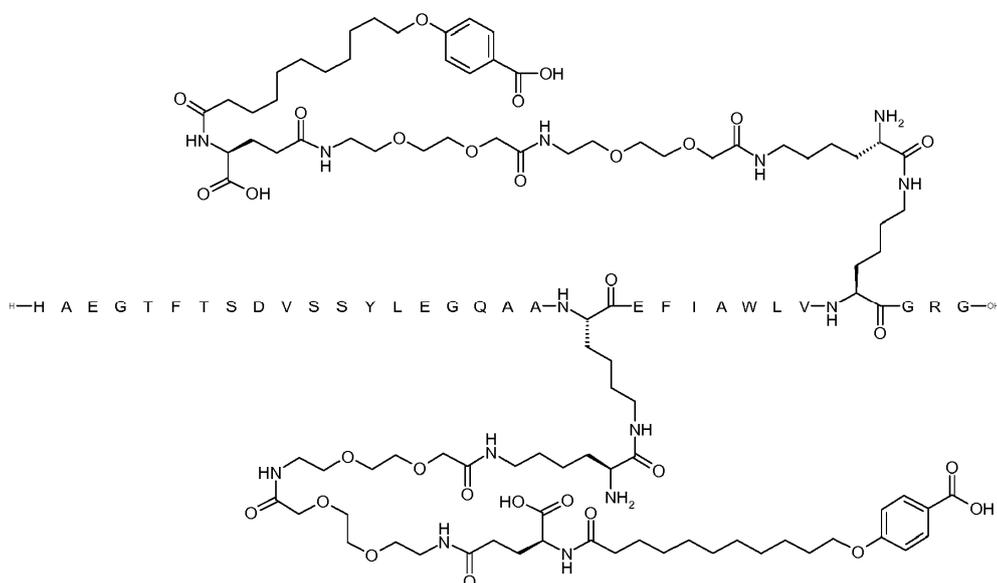
20 N^ε26-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^ε34-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 22:



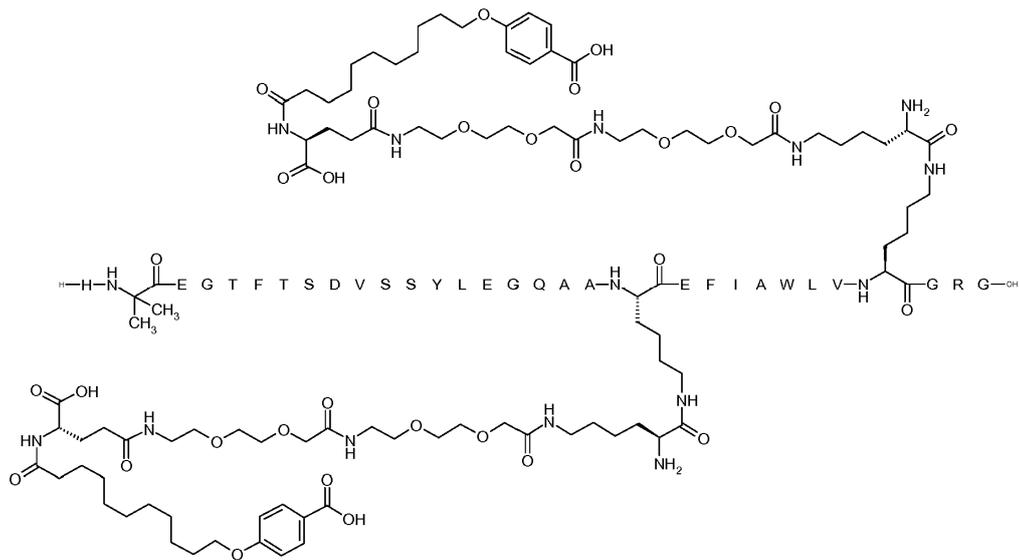
5 N^{26} -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N^{34} -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 25:



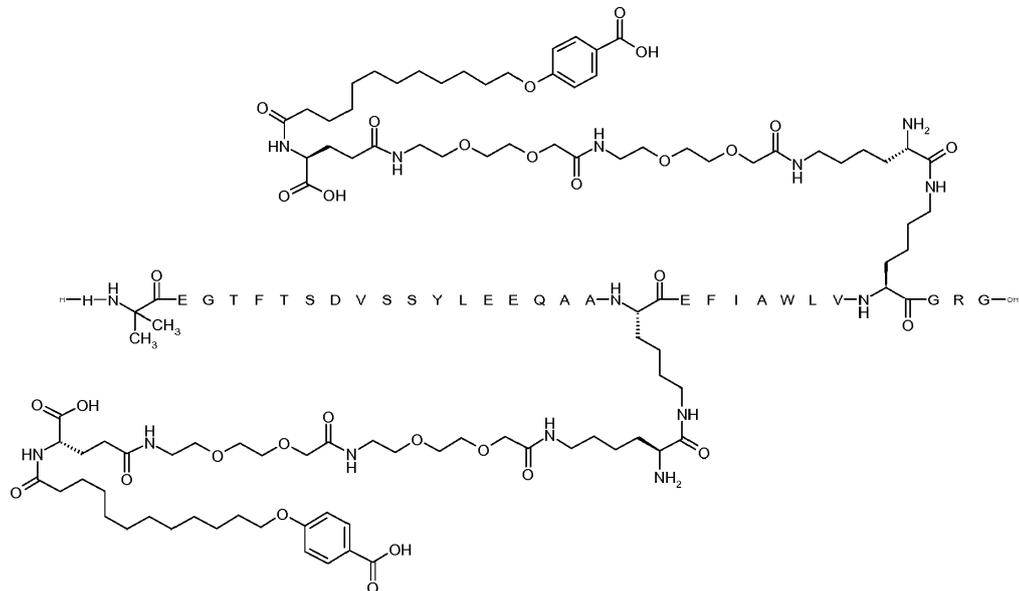
10 N^{26} -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N^{34} -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 26:



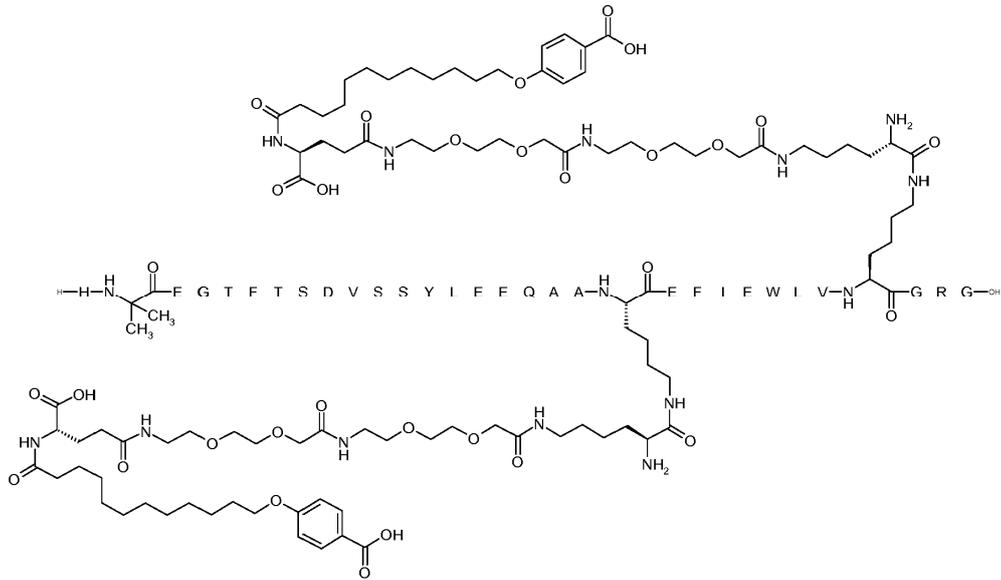
5 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 29:



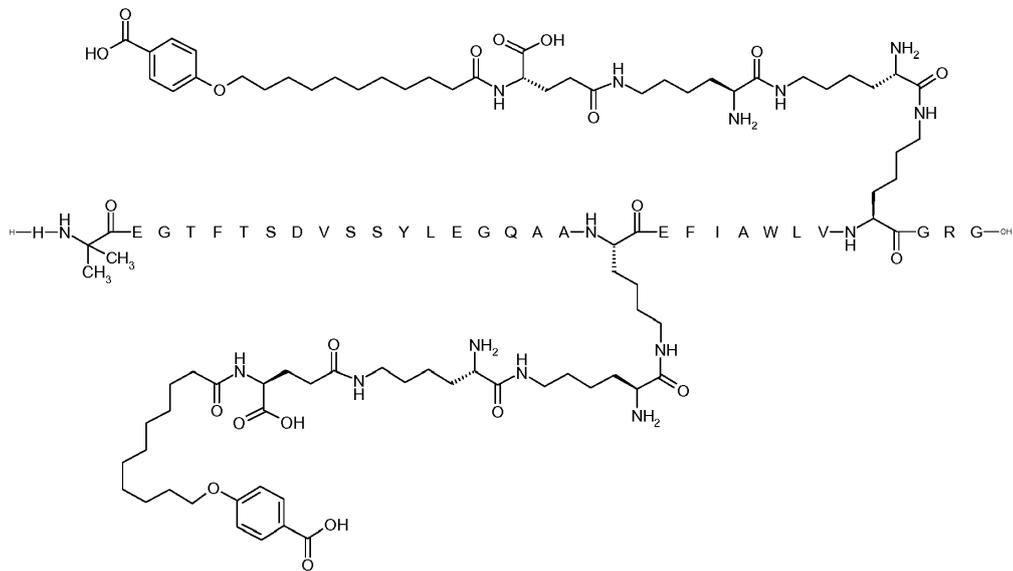
10 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸, Glu²²]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 30:



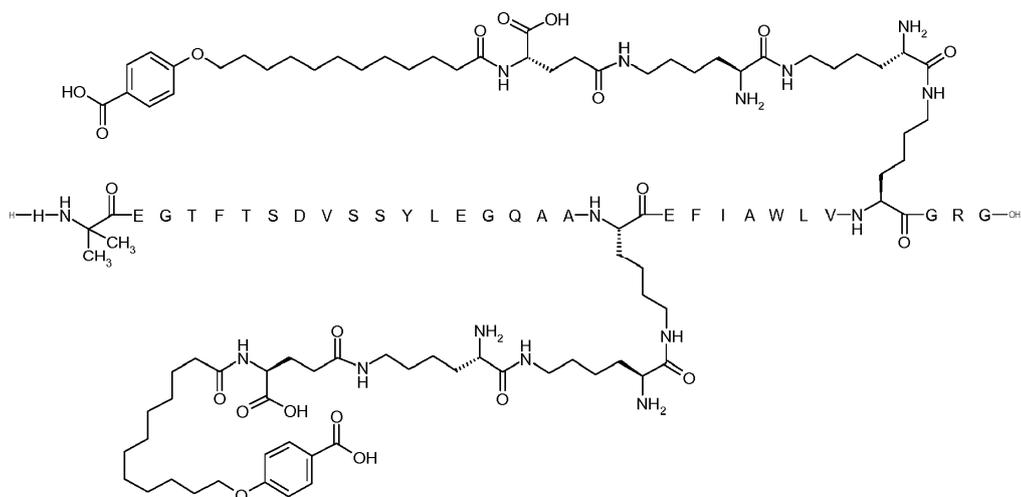
5 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸,Glu²²,Glu³⁰]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 31



10 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[(2S)-2-amino-6-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[(2S)-2-amino-6-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

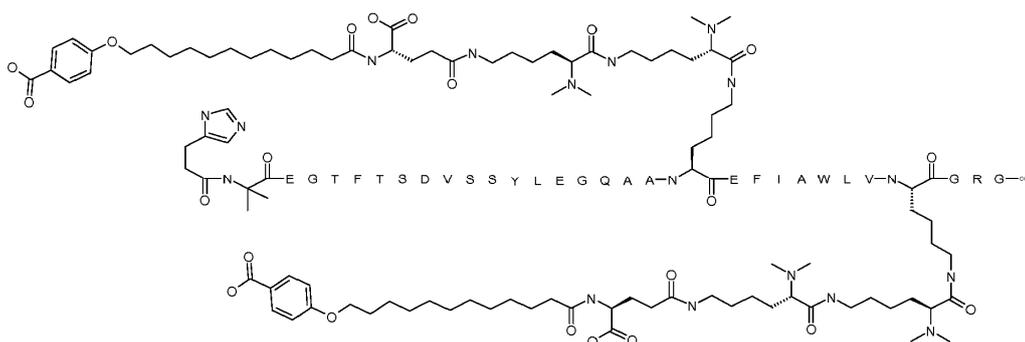
Quím. 32:



N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

5

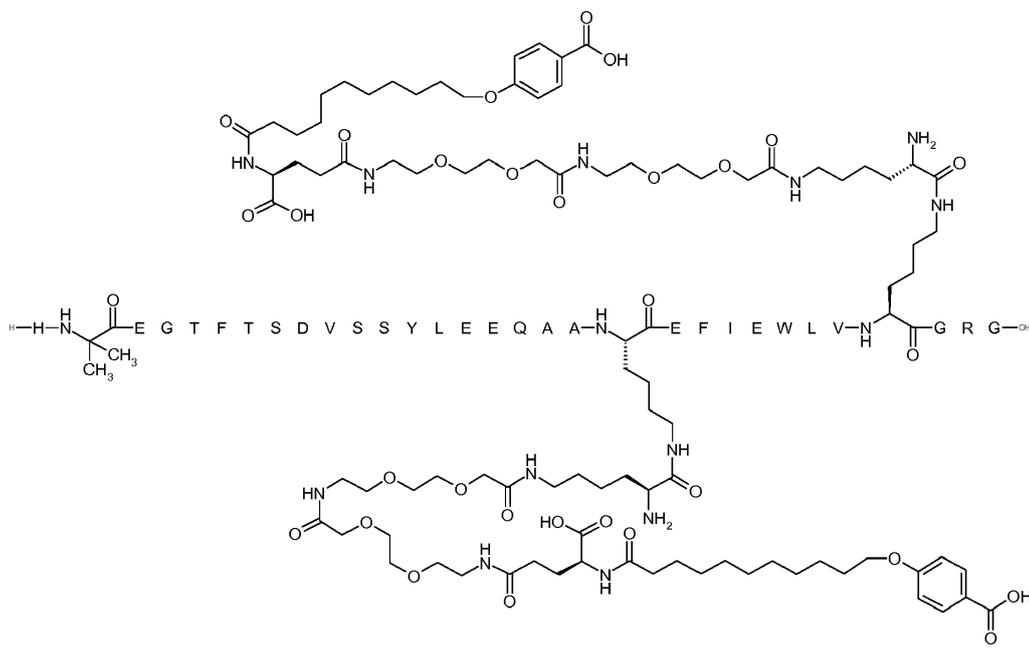
Quím. 33:



N^{E26} -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil], N^{E34} -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]-[Imp⁷,Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

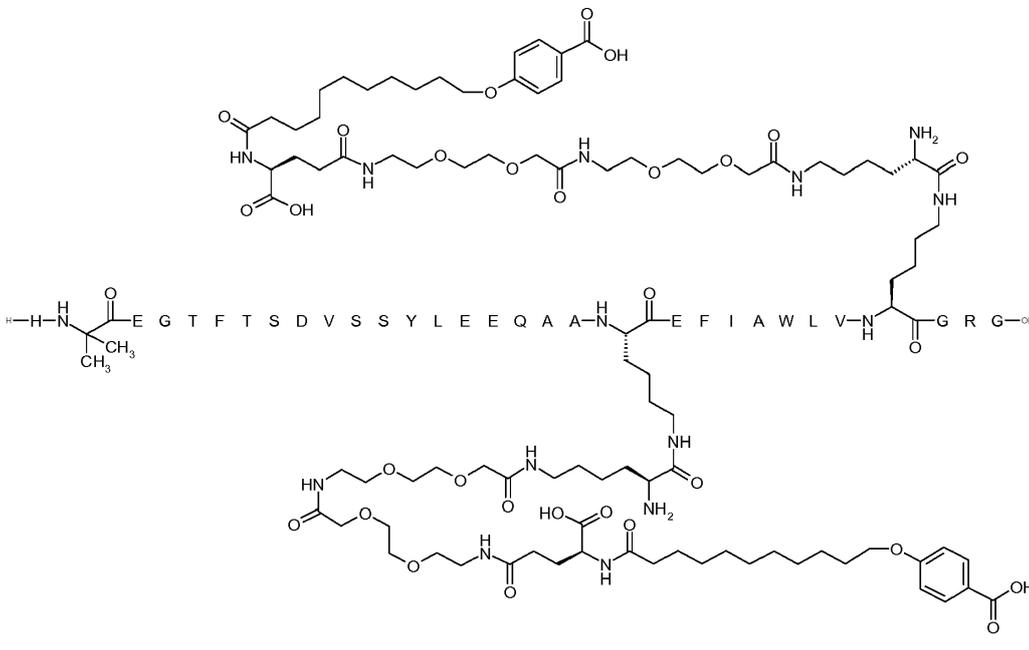
10

Quím. 34:



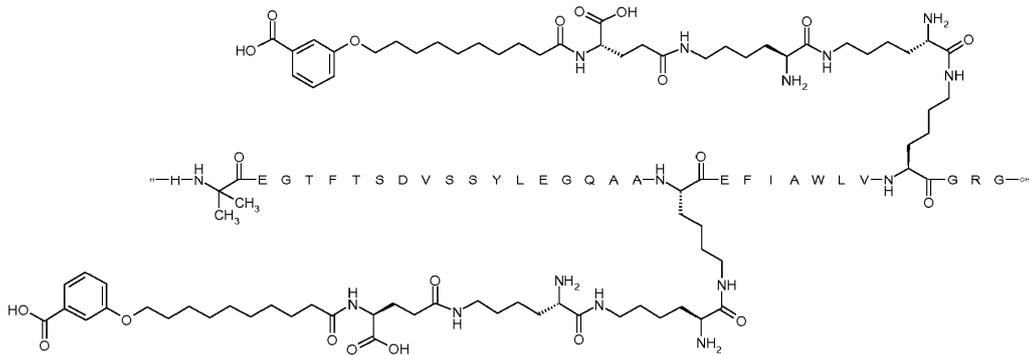
5 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸,Glu²²,Glu³⁰]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 35:



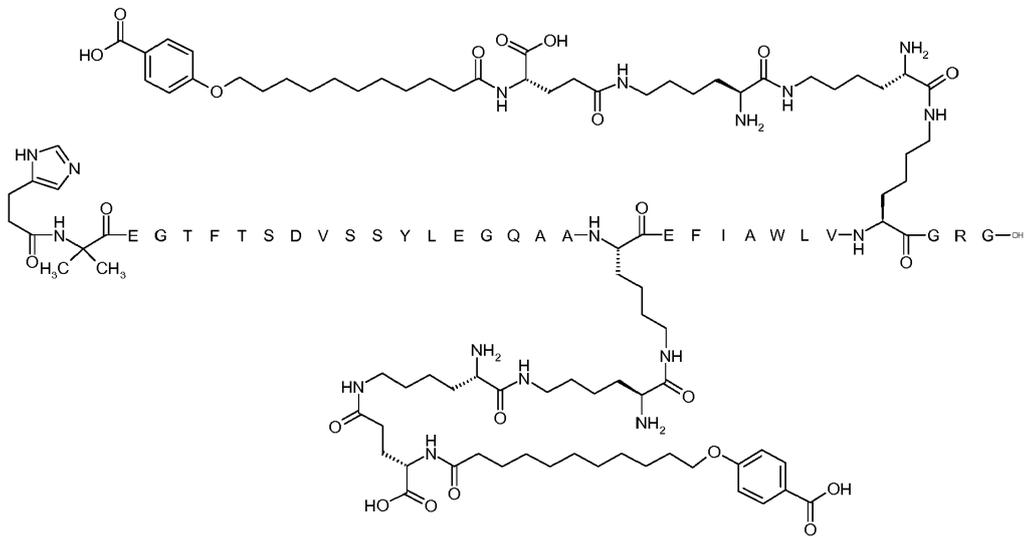
10 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], $N^{\epsilon 34}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib⁸,Glu²²]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 36:



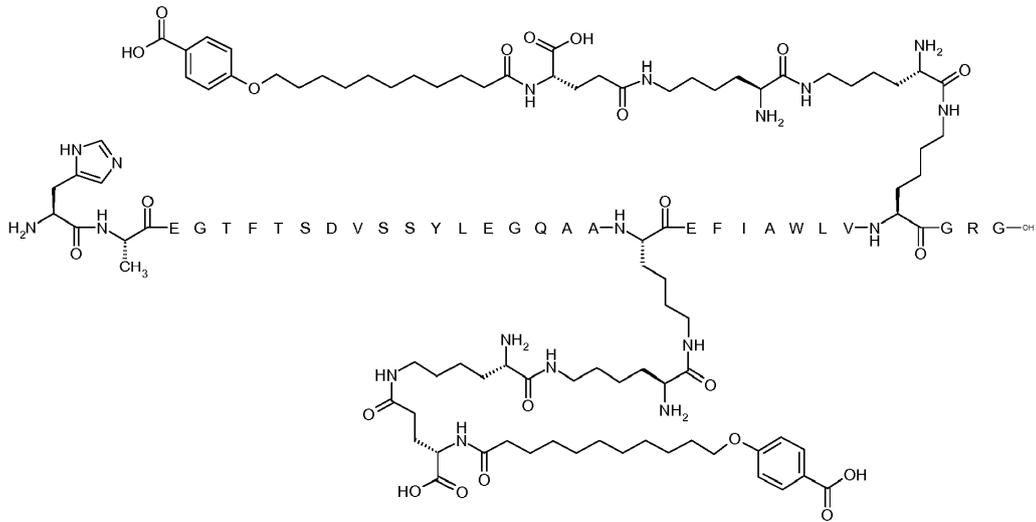
N^{26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(3S)-4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

5 Quím. 37:



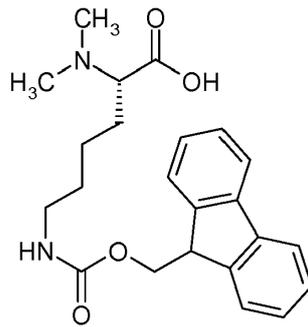
N^{26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N^{34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Imp⁷,Aib⁸]-GLP-1-(7-37)-péptido,

10 Quím. 38:



5 N^{E26} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil], N^{E34} -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 39:



y ácido (S)-2-dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ylmetoxicarbonilamino)hexanoico;

o un éster, amida o sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 12. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como un medicamento.

13. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos de la alimentación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y/o el síndrome del ovario poliquístico y/o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad diabética.