

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 770**

51 Int. Cl.:

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: **05.09.2008 PCT/EP2008/061755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009 WO09030738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08803724 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2190872**

54 Título: **Derivados del péptido-1 similar al glucagón y su uso farmacéutico**

30 Prioridad:

05.09.2007 EP 07115746

28.01.2008 EP 08101008

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

18.06.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

SPETZLER, JANE;

SCHÄFFER, LAUGE;

LAU, JESPER;

KRUSE, THOMAS;

GARIBAY, PATRICK WILLIAM;

RUNGE, STEFFEN;

THØGENSEN, HENNING y

PETTERSSON, INGRID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 672 770 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 del péptido-1 similar al glucagón y su uso farmacéutico

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los péptidos terapéuticos, es decir, a nuevos péptidos de acción prolongada derivados del Péptido-1 similar al Glucagón (GLP-1, por sus siglas en inglés).

10 Antecedentes de la invención

Se han usado una serie de enfoques diferentes para modificar la estructura de los compuestos del GLP-1 para proporcionarles una mayor duración de la acción in vivo.

15 El documento WO 2006/097535 describe diversos agonistas de péptidos de la familia del glucagón con actividad similar a la secretina y sus usos terapéuticos. En sus ejemplos 3 y 5 se describen derivados de GLP-1(7-37) que comprenden una secuencia de GLP-1(7-37) modificada. Estos derivados, sin embargo, no tienen un residuo de Glu en la posición 22 y un residuo de Arg en la posición 26.

20 El documento WO 01/04156 describe péptidos que disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Los compuestos 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 y 13 son derivados de GLP-1, sin embargo, ninguno de estos compuestos tiene un residuo de Glu en la posición 22 y un residuo de Arg en la posición 26.

25 El documento EP 1364967 describe péptidos insulínotropicos similares al glucagón, composiciones y métodos. Ninguna de las cinco composiciones de GLP-1 del Ejemplo 1 comprende una secuencia de GLP-1 modificada que tenga Glu en la posición 22 y Arg en la posición 26.

30 El documento WO 98/08871 describe derivados de GLP-1 de acción prolongada que incluyen liraglutida, que es un derivado de GLP-1 para su administración una vez al día desarrollada por Novo Nordisk A/S. Se espera que la liraglutida se comercialice para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 a partir del 2009. La liraglutida no tiene Glu en la posición 22 ni Arg en la posición 26. El derivado descrito en el Ejemplo 30 de esta referencia sí, pero no se derivatiza en la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39.

35 El documento WO 2005/027978 describe nuevos derivados de GLP-1 que incluyen tres que comprenden una secuencia de GLP-1(7-37) modificada que tiene una Glu en la posición 22 y una Arg en la posición 26. Estos derivados, sin embargo, no se derivatizan en la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39.

40 Runge y otros (Journal of Biological Chemistry, volumen 283, núm. 17, pp. 11,340-11,347), que se publicó después de las fechas de prioridad de la presente invención, describe la estructura cristalina del dominio extracelular del receptor de GLP-1 unido al ligando.

45 Muchos pacientes con diabetes, particularmente en el segmento de diabetes tipo 2, presentan la llamada "fobia a la aguja", es decir, un temor sustancial a inyectarse a sí mismos. En el segmento de diabetes tipo 2, la mayoría de los pacientes se tratan con agentes hipoglucemiantes orales, y dado que se espera que los compuestos de GLP-1 sean un producto farmacéutico inyectable para administrarse a estos pacientes, el temor a las inyecciones puede convertirse en un obstáculo serio para el uso generalizado de compuestos clínicamente muy prometedores. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que puedan administrarse menos de una vez al día, por ejemplo una vez cada dos o tres días, preferentemente una vez por semana, a la vez que conservan un perfil clínico aceptable, u opcionalmente, a través de una administración no invasiva tal como la administración pulmonar, nasal, sublingual, bucal u oral.

50 Un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado de GLP-1 química, física y enzimáticamente estable, preferentemente con un contenido alto de alfa-hélices.

55 Un objeto adicional de la invención es proporcionar un derivado de GLP-1 de acción prolongada, es decir, que tenga un régimen de administración como se describió anteriormente.

60 Otro objeto de esta invención es proporcionar un derivado de GLP-1 con alta potencia (afinidad por el receptor) para reducir la dosis terapéutica usada, por ejemplo, para la dosificación s.c. una vez por semana o alternativamente para el suministro no invasivo.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un derivado de GLP-1 con una alta afinidad de unión al dominio extracelular del receptor de GLP-1 (GLP-1R).

65 Otro objeto de esta invención es proporcionar un derivado de GLP-1 con alta afinidad de unión a la albúmina lo que protege al péptido de la degradación proteolítica y reduce la depuración renal del péptido.

La potencia, estabilidad, vida media, afinidad de unión a la albúmina, y afinidad de unión al dominio extracelular del receptor de GLP-1 son propiedades de relevancia potencial para el objetivo global de lograr derivados de GLP-1 de acción prolongada, estables y por supuesto, con actividad terapéutica, con un potencial para su administración una vez por semana.

5

Breve descripción de la invención

La presente solicitud describe un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1(7-37) modificada que tiene: i) un total de 2-12 modificaciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1), que incluye a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-37), y b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-37); y ii) que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39 de GLP-1(7-37).

10

15 La invención se refiere a tales compuestos de GLP-1 derivatizados en una posición equivalente a la posición 31.

En un aspecto adicional, se proporcionan composiciones farmacéuticas y métodos y usos de los derivados de acuerdo con la invención.

20

Descripción de la invención

Definiciones y modalidades preferidas

En la presente descripción, los términos siguientes tienen los significados indicados:

25

El término "polipéptido" y "péptido" como se usa en la presente descripción significan un compuesto formado por al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético, así como también aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético son, por ejemplo, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados mediante síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometil benzoico, y ácido antranílico.

30

35

Los 22 aminoácidos proteínogénicos son: Alanina, Arginina, Asparagina, Ácido Aspártico, Cisteína, Cistina, Glutamina, Ácido Glutámico, Glicina, Histidina, Hidroxiprolina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptófano, Tirosina y Valina.

40

Por lo tanto, un aminoácido no proteínogénico (que puede designarse, además, como un aminoácido no natural) es una porción que puede incorporarse en un péptido mediante enlaces peptídicos, pero no es un aminoácido proteínogénico. Los ejemplos son γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, los D-aminoácidos tales como D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos no proteínogénicos comprenden los aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir, isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico, des-amino-histidina (abreviada DesaminoHis, nombre alternativo ácido imidazopropiónico, abreviado Impr), los análogos beta de aminoácidos tales como β -alanina etcétera, D-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N^o-acetil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, ácido α,α -dimetil-glutámico, m-CF₃-fenilalanina (abreviada m-CF₃-fe), ácido α,β -diaminopropiónico (abreviado Dap), 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina, 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.

45

50

El término "análogo" como se usa en la presente descripción con referencia a un polipéptido significa un péptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde se ha eliminado un residuo de aminoácido del péptido en el extremo C-terminal del péptido o en donde se ha añadido un residuo de aminoácido al extremo C-terminal del péptido.

55

El término "péptido modificado" como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido modificado como se definió anteriormente. Para los propósitos de la presente, este término se usa indistintamente con el término "secuencia peptídica modificada". Consistentemente con la presente, el término "modificación" cuando se usa en la presente descripción en relación con secuencias peptídicas se refiere a sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

60

65 Para los propósitos de la presente, cualquier sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos se refiere a la secuencia de GLP-1(7-37) humano que se incluye en la presente descripción como sec. con núm. de ident.: 1. Sin

embargo, la numeración de los residuos de aminoácidos en la lista de secuencias comienza siempre con núm. 1, mientras que para el propósito de la presente se quiere, mediante el seguimiento de la práctica establecida en la técnica, comenzar con el residuo de aminoácido núm. 7 y asignarle el número 7. Por lo tanto, generalmente, cualquier referencia en la presente descripción al número de posición de la secuencia de GLP-1(7-37) es a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y termina con Gly en la posición 37.

A menudo se usa un sistema simple para describir análogos: Por ejemplo [Arg³⁴]GLP-1(7-37)Lys designa un análogo de GLP-1(7-37) en donde la lisina de origen natural en la posición 34 se ha sustituido con arginina y en donde se ha añadido una lisina al residuo de aminoácido C-terminal, es decir, al Gly³⁷. Este análogo de GLP-1 en consecuencia tiene dos modificaciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), a saber, una sustitución y una adición.

La expresión "una posición equivalente a" cuando se usa en la presente descripción para caracterizar una secuencia de GLP-1(7-37) modificada se refiere a la posición correspondiente en la secuencia de GLP-1(7-37) natural (que tiene la sec. con núm. de ident.: 1). Las posiciones correspondientes se deducen fácilmente, por ejemplo, por escritura a mano y observación simples. En la alternativa, puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "align", que es un alineamiento de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa de alineaciones descrito por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. Para el alineamiento, puede usarse la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 y la matriz de identidad predeterminada, y la penalización para el primer residuo en una interrupción puede fijarse en -12 y las penalizaciones para residuos adicionales en una interrupción en -2.

Como otro ejemplo, el derivado de GLP-1 del Ejemplo 1 en la presente descripción comprende la siguiente secuencia de GLP-1(7-37) modificada: [desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1(7-37)amida, que tiene un total de 5 modificaciones de aminoácidos (en este caso todas sustituciones), que incluye un Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-37), y un Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-37).

Debe entenderse que todos los aminoácidos para los que no se indica el isómero óptico son el isómero L.

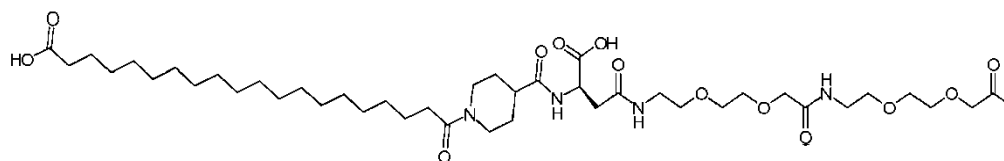
El término "derivado" como se usa en la presente descripción en relación con un péptido significa un péptido modificado químicamente o su análogo, en donde al menos un sustituyente no está presente en el péptido no modificado o su análogo, es decir, un péptido que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y similares.

Los derivados de GLP-1 que se describen en la presente se derivatizan con un residuo de unión a la albúmina o se pegilan en una posición seleccionada de la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39. La derivatización se refiere a un enlace covalente como se explicó anteriormente.

Por ejemplo, un residuo de lisina o residuo de cisteína puede unirse a un residuo de unión a la albúmina mediante un enlace químico. Dicho enlace químico puede obtenerse como un ejemplo mediante la derivatización de un grupo épsilon amino de lisina mediante acilación con un éster activo de un residuo de unión a la albúmina tal como un ácido graso largo.

Un ejemplo de un derivado de GLP-1 (un derivado de un análogo de GLP-1(7-37)) es N-épsilon37{2-[2-(2-[2-((R)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil[desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1(7-37)amida (el compuesto del Ejemplo 1 en la presente descripción). En este compuesto, la Gly de origen natural en la posición 37 se ha sustituido con lisina que se ha derivatizado en N-épsilon37 con el siguiente residuo de unión a la albúmina:

{2-[2-(2-[2-((R)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil (estructura 1)



Estructura 1

y en donde la histidina de origen natural en la posición 7 se ha sustituido con desaminoHis y la glicina de origen natural en la posición 22 se ha sustituido con glutamato y la lisina en las posiciones 26 y 34 se ha sustituido con arginina. En este derivado, el análogo de GLP-1(7-37) de [desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1(7-37)amida se ha derivatizado (modificado covalentemente con un enlace amida) con un residuo de unión a la albúmina en una posición equivalente a la posición 37 de GLP-1(7-37), a saber, en el grupo épsilon amino de Lys en

la posición 37. En consecuencia, un derivado de GLP-1 es un compuesto con dos constituyentes: Una parte del péptido GLP-1 y una parte derivada que se unen covalentemente entre sí.

5 El residuo de aminoácido que se derivatiza puede comprender un grupo amino. Ejemplos de residuos de aminoácidos que comprenden un grupo amino son lisina, ornitina, lisina épsilon-N-alquilada tal como épsilon-N metil lisina, O-aminoetilserina, O-aminopropilserina o serinas O alquiladas más largas que contienen un grupo amino primario o secundario en la cadena lateral. En un aspecto adicional de la invención, el residuo de aminoácido derivatizado comprende un grupo amino primario en una cadena lateral. Ejemplos de residuos de aminoácidos que comprenden un grupo amino primario son lisina, ornitina, O-aminoetilserina, O-aminopropilserina o serinas O alquiladas más largas que contienen un grupo amino primario en la cadena lateral. En aún un aspecto adicional de la invención, el residuo de aminoácido derivatizado es lisina. En aún un aspecto adicional de la invención, el derivado de acuerdo con la invención solo se derivatiza en una posición, por ejemplo, solo se derivatiza un residuo de aminoácido.

15 Otros ejemplos de conexión de dos porciones químicas como se usan en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la alquilación, la formación de éster, la formación de amida o el acoplamiento de maleimida.

20 El término "péptido GLP-1" como se usa en la presente descripción significa GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) o su análogo GLP-1(7-37).

El término "GLP-1(7-37)" pretende incluir GLP-1(7-37) (es decir, el péptido), así como también la(s) amida(s) correspondiente(s), y lo mismo se aplica a los análogos de GLP-1(7-37).

25 En una modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención es una amida. En otra modalidad particular es un péptido, es decir, la porción del péptido GLP-1 del derivado tiene un grupo carboxílico libre en el C-terminal.

30 Los términos "GLP-1(7-34)", "GLP-1(7-35)", "GLP-1(7-36)", "GLP-1(7-38)", "GLP-1(7-39)", "GLP-1(7-40)", "GLP-1(7-41)" o sus derivados se usan de vez en cuando en la presente descripción para especificar la longitud exacta de la porción del péptido GLP-1 de un derivado de la invención. Por ejemplo, "un derivado de GLP-1(7-34)" se refiere a un derivado de GLP-1(7-37) en el que se han eliminado los últimos tres residuos de aminoácidos del C-terminal. Como otro ejemplo, "un derivado de GLP-1(7-39)" se refiere a un derivado de GLP-1(7-37) en el que se han añadido dos residuos de aminoácidos al C-terminal. Un derivado de GLP-1 descrito en la presente tiene la secuencia de fórmula (I):

35 Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃- Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Xaa₂₈-
lle-Xaa₃₀ -Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇- Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-R fórmula (I) (sec. con núm. de
ident.: 2)

en donde

40 (Xaa₇ - Xaa₈) es (L-histidina-Aib), (desamino-histidina-alanina), o (desamino-histidina-Aib);

Xaa₉ es Glu, o un derivado de Glu;

Xaa₁₆ es Val, o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys, o Arg;

45 Xaa₂₀ es Leu, o Lys;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys, o Arg;

Xaa₂₄ es Ala, o Asn;

Xaa₂₅ es Ala, o Val;

Xaa₂₇ es Glu, Ala, o Leu;

50 Xaa₂₈ es Phe, o un derivado de Phe;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;

Xaa₃₁ es Trp, Cys, o Lys;

Xaa₃₃ es Val, Cys, o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Cys, Glu, Asn, Dap, o Arg;

55 Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente;

Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Cys, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;

Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;

60 Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;

Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y

R es amida, o está ausente;

65 siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

Un ejemplo no limitante de un "derivado de Glu" es alfa,alfa-dimetil-Glu.

Un ejemplo no limitante de "un derivado de Phe" es CF₃-Phe, tal como m-CF₃-Phe (ver, por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 3).

El término épsilon-amino-Lys (o épsilon-Lys) pretende indicar que el residuo de aminoácido núm. 38, lisina, se une al péptido GLP-1(7-37) a través de su grupo épsilon amino, no (como es habitualmente el caso) a través de su grupo alfa amino (ver, por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 28). Otro derivado de GLP-1 descrito en la presente tiene la secuencia de fórmula (II):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-R fórmula (II) (sec. con núm. de ident.: 3)

en donde

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

Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, 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;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;

Xaa₃₁ es Lys, o Trp;

Xaa₃₃ es Val, o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Dap, o Arg;

Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente;

Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;

Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;

Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;

Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y

R es amida, o está ausente;

siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

El término "conector" como se usa en la presente descripción significa un espaciador (los dos términos, espaciador y conector, se usan indistintamente en la presente descripción) que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina o un polímero de polietilenglicol.

El término "aceptable farmacéuticamente" como se usa en la presente descripción significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no produce eventos adversos graves en los pacientes, etcétera.

El término "excipiente", como se usa en la presente descripción, significa los compuestos químicos que se añaden normalmente a las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, tampones, agentes de tonicidad, conservantes y similares.

El término "cantidad eficaz", como se usa en la presente descripción, significa una dosis que es suficiente para que sea eficaz para el tratamiento del paciente en comparación con ningún tratamiento.

El término "composición farmacéutica" como se usa en la presente descripción significa un producto que comprende un derivado activo de acuerdo con la invención, o su sal, amida, alquilo, éster, o similar aceptable farmacéuticamente, junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante y opcionalmente un modificador de tonicidad y/o un estabilizador. Por lo tanto, una composición farmacéutica se conoce también en la técnica como una formulación farmacéutica. El término "tratamiento de una enfermedad" como se usa en la presente descripción significa el manejo y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento incluye la administración del derivado activo de acuerdo con la invención para eliminar o controlar la enfermedad, afección o trastorno así como también para aliviar los síntomas o complicaciones asociados con la enfermedad, afección o trastorno.

En un aspecto el conector comprende una o más unidades de alquilenglicol, tales como de 1 a 5 unidades de alquilenglicol. Las unidades de alquilenglicol son en un aspecto adicional etilenglicol, propilenglicol o butilenglicol, pero también pueden ser alquilenglicoles más grandes.

5 En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo seleccionado de

$-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{-Q}_q-$, en donde

l, m y n son independientemente 1-20 y p es 0-10,

10

Q es $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$,

q es un número entero en el intervalo de 0 a 5,

15 cada D, E y G se seleccionan independientemente de $-\text{O}-$, $-\text{NR}^3-$, $-\text{N}(\text{COR}^4)-$, $-\text{PR}^5(\text{O})-$, y $-\text{P}(\text{OR}^6)(\text{O})-$, en donde R^3 , R^4 , R^5 , y R^6 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo, Z se selecciona de $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_s-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ o $-\text{NHC}(\text{O})-$, en donde s es 0 o 1.

20 En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde l es 1 o 2, n y m son independientemente 1-10 y p es 0-10.

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde D es $-\text{O}-$.

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde E es $-\text{O}-$.

25

En aún otro aspecto el conector hidrófilo es

$-\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$, en donde m es 1-10, p es 1-3, y Q es $-\text{Z}-\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_m(\text{CH}_2)_p-$ en donde Z es como se definió anteriormente.

30

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde q es 1.

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde G es $-\text{O}-$.

35 En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde Z se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, y $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$.

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde q es 0.

40 En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente en donde l es 2.

En otro aspecto el conector es un conector hidrófilo como se definió anteriormente, en donde n es 2.

45 En un aspecto se usa un "conector hidrófilo" que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina con una porción química.

En un aspecto el conector hidrófilo es

$-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-[(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_m-\text{CH}_2]_p-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_l-\text{O}-[(\text{CH}_2)_n-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_p]_q-\text{NH}-$,

50

en donde l, m, n, y p son independientemente 1-5, y q es 0-5.

En aún otro aspecto de esta invención, el conector hidrófilo es

$-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2[\text{NHC}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_q-\text{NH}-$,

55

en donde q es 0-5.

En aún otro aspecto el conector hidrófilo es

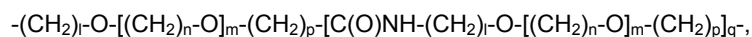
60

$-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$.

En aún otro aspecto el conector hidrófilo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_{m+1}(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$ en donde m y p es independientemente 0-10, y Q es $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$ como se definió anteriormente.

65

En aún otro aspecto el conector hidrófilo es



en donde l, m, n, y p son independientemente 1-5, y q es 0-5.

5 En un aspecto adicional el conector comprende un residuo de aminoácido excepto Cys, o un dipéptido tal como Gly-Lys. En el presente texto, la expresión "un dipéptido tal como Gly-Lys" se usa para designar un dipéptido en donde el residuo de aminoácido C-terminal es Lys, His o Trp, preferentemente Lys, y en donde el residuo de aminoácido N-terminal se selecciona del grupo que comprende Ala, Arg, Asp, Asn, Gly, Glu, Gln, Ile, Leu, Val, Phe y Pro. Los polímeros PEG adecuados están típicamente disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

En un aspecto el derivado de GLP-1 se ha pegilado.

15 El polímero PEG puede tener un peso molecular mayor que 700 D, un peso molecular mayor que 5 kD, mayor que 10 kD, y mayor que 20 kD. El polímero PEG puede ser lineal o ramificado. En los casos donde el polímero PEG es mayor que 20 KDa, el polímero PEG tiene preferentemente una estructura ramificada, tal como, por ejemplo, un péptido PEG ramificado de 43 kD (catálogo Shearwater 2001 # 2D3XOT01, mPEG2-MAL).

20 La unión de un PEG a un péptido intacto puede llevarse a cabo mediante la unión del PEG en el lado opuesto de la superficie del péptido que interactúa con el receptor.

Existen varias estrategias para acoplar PEG a los péptidos (ver, por ejemplo, Veronese, Biomaterials 22:405-417, 2001).

25 Los expertos en la técnica, por lo tanto, podrán usar técnicas bien conocidas para unir el polímero PEG a los péptidos de GLP-1 descritos en la presente.

30 Brevemente, la PEGilación de cisteína es un método para la PEGilación específica del sitio, y puede llevarse a cabo mediante la introducción de una mutación única de cisteína en una de las posiciones específicas de la amilina humana o del análogo de la amilina y después hacer reaccionar el péptido resultante con un reactivo de PEGilación específico de cisteína, tal como PEG-maleimida. Puede ser necesario mutar el péptido para permitir la PEGilación específica del sitio. Por ejemplo, si el péptido contiene residuos de cisteína, estos necesitarán sustituirse con aminoácidos conservativos para asegurar la PEGilación específica del sitio. Además, los conectores rígidos, que incluyen pero no se limitan a "GGS", "GGSGGS" y "PPPS" pueden añadirse al C-terminal, pero antes del sitio de unión del PEG (es decir, un único residuo de cisteína). El derivado de GLP-1 de acuerdo con la invención se ha derivatizado con un residuo de unión a la albúmina.

40 En una modalidad, el residuo de unión a la albúmina es un residuo lipófilo. En una modalidad adicional, el residuo lipófilo se une a un residuo de lisina opcionalmente a través de un conector mediante conjugación química tal como por alquilación, acilación, formación de éster, o formación de amida o a un residuo de cisteína mediante acoplamiento de maleimida.

45 En una modalidad adicional de la invención, el residuo de unión a la albúmina se carga negativamente a pH fisiológico. En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina comprende un grupo que puede estar cargado negativamente. Un grupo preferido que puede estar cargado negativamente es un grupo ácido carboxílico.

50 En aún otra modalidad de la invención, el residuo de unión a la albúmina se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo de cadena lineal, un grupo alquilo ramificado, un grupo que tiene un grupo ácido ω -carboxílico y un esqueleto de ciclopentanofenantreno hidrogenado parcial o completamente.

En una modalidad adicional de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un residuo cibacronilo.

55 En una modalidad adicional de la invención, el residuo de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 8 a 20 átomos de carbono.

60 En una modalidad adicional de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo seleccionado del grupo que comprende $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO-}$, en donde r es un número entero de 4 a 38, preferentemente un número entero de 4 a 24, con mayor preferencia seleccionado del grupo que comprende $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO-}$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO-}$ y $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO-}$.

En otra modalidad de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo de un ácido alcano de cadena lineal o ramificada α,ω -dicarboxílico.

65 En otra modalidad particular, el derivado de GLP-1 de acuerdo con la invención comprende un espaciador hidrófilo entre la secuencia de GLP-1 modificada y uno o más residuo(s) de unión a la albúmina.

El espaciador hidrófilo puede ser una porción de oligoetilenglicol no ramificado con grupos funcionales apropiados en ambos terminales que forman un puente entre un grupo amino de la secuencia de GLP-1 modificada y un grupo funcional del residuo de unión a la albúmina.

- 5 Las composiciones de derivados de GLP-1 que los incluyen, y los métodos para usarlos se enumeran cerca del comienzo de la parte experimental de la presente solicitud.

Propiedades funcionales

- 10 Varios derivados de GLP-1 de la invención se han sintetizado y evaluado como se describe en la parte experimental.

Los derivados de GLP-1 de la invención tienen varias propiedades ventajosas y beneficiosas como se explica a continuación, por referencia a los Ejemplos.

- 15 En un primer aspecto, el derivado de GLP-1 de la invención tiene un perfil de acción prolongada, que lo hace adecuado potencialmente para la administración con menor frecuencia que una vez al día, preferentemente con un potencial para su administración una vez por semana, o incluso menos frecuente. El perfil de acción puede evaluarse en experimentos farmacocinéticos con animales de laboratorio como ratones o cerdos. Se encuentran experimentos adecuados en el Ejemplo 39 (minicerdos) y el Ejemplo 43 (ratones) de la presente solicitud.

- 20 Como se describe en el Ejemplo 39 en minicerdos, (i) el derivado de GLP-1 puede administrarse s.c. o i.v., preferentemente s.c.; (ii) los cerdos son preferentemente minicerdos de Göttingen, preferentemente de 5 meses de edad aproximadamente y peso de 8-10 kg; (iii) los animales están preferentemente en ayunas antes de la administración, preferentemente como se describe; (iv) la inyección se administra preferentemente como se indica; (v) el número de animales evaluados es preferentemente como se indica; (vi) la dosis es preferentemente como se indica; y/o (vii) además, las muestras de sangre se toman, se recogen y se analizan preferentemente como se indica en este Ejemplo.

- 25 Los experimentos farmacocinéticos como el del Ejemplo 39 resultan en un perfil de concentración plasmática del compuesto en cuestión frente al tiempo, sobre la base del cual puede determinarse la vida media, $T_{1/2}$, preferentemente como se describe en el Ejemplo 39.

- 30 En una primera modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 18 horas, preferentemente superior a 24 horas, con mayor preferencia superior a 28 horas, aún con mayor preferencia superior a 30 horas, con la máxima preferencia superior a 32 horas.

- 35 En una segunda modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 32 horas, preferentemente superior a 34 horas, con mayor preferencia superior a 36 horas, aún con mayor preferencia superior a 38 horas, con la máxima preferencia superior a 40 horas.

- 40 En una tercera modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 45 horas, preferentemente superior a 50 horas, con mayor preferencia superior a 55 horas, aún con mayor preferencia superior a 60 horas, con la máxima preferencia superior a 65 horas.

- 45 En una cuarta modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 45 horas, preferentemente superior a 50 horas, con mayor preferencia superior a 55 horas, aún con mayor preferencia superior a 60 horas, con la máxima preferencia superior a 65 horas.

- 50 En una quinta modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 70 horas, preferentemente superior a 75 horas, con mayor preferencia superior a 80 horas, aún con mayor preferencia superior a 85 horas, con la máxima preferencia superior a 90 horas.

- 55 En una sexta modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en minicerdos, es superior a 92 horas, preferentemente superior a 94 horas, con mayor preferencia superior a 96 horas, aún con mayor preferencia superior a 98 horas, con la máxima preferencia superior a 100 horas.

- 60 En una séptima modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una vida media in vivo de al menos 50 horas después de la administración s.c. a minicerdos, y preferentemente una vida media in vivo de al menos 80 horas después de la administración s.c. a minicerdos.

- 65

En consecuencia los intervalos de vida media ilustrativos (tiempo indicado en horas, h) del derivado de GLP-1 de la invención, determinados en minicerdos por administración s.c., son: 20-100, 30-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, o 90-100 (horas).

5 La vida media del derivado de GLP-1 de la invención puede determinarse, además, en un estudio de dosis-respuesta en ratones db/db, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 43. Como se describe en este Ejemplo, (i) los ratones son preferentemente de Taconic; (ii) de 10-12 semanas de edad; (iii) tienen acceso libre a la alimentación estándar tal como Altromin 1324 y agua del grifo; (iv) se mantienen a 24 °C; (v) son aclimatados por 1 semana; (vi) distribuidos en 7 grupos (preferentemente n=6) en base a los valores medios de glucosa en sangre coincidentes; (vii) reciben tratamiento como se describe en el ejemplo; (viii) reciben dosis como se describe; (ix) la glucosa en sangre se evalúa de acuerdo con un esquema como se describe, evaluado preferentemente como se describe; y/o (x) la vida media se determina en base a las determinaciones de glucosa en sangre frente al tiempo, preferentemente como se describe en el ejemplo.

15 En una primera modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en ratones db/db, es superior a 10 horas, preferentemente superior a 11 horas, con mayor preferencia superior a 12 horas, aún con mayor preferencia superior a 13 horas, con la máxima preferencia superior a 14 horas.

20 En una segunda modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en ratones db/db, es superior a 15 horas, preferentemente superior a 16 horas, con mayor preferencia superior a 17 horas, aún con mayor preferencia superior a 18 horas, con la máxima preferencia superior a 19 horas.

25 En una tercera modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en ratones db/db, es superior a 20 horas, preferentemente superior a 21 horas, con mayor preferencia superior a 22 horas, aún con mayor preferencia superior a 23 horas, con la máxima preferencia superior a 24 horas.

30 En una cuarta modalidad particular, la vida media del derivado de GLP-1 de la invención, después de la administración s.c. en ratones db/db, es superior a 25 horas, preferentemente superior a 26 horas, con mayor preferencia superior a 27 horas, aún con mayor preferencia superior a 28 horas, con la máxima preferencia superior a 29 horas.

35 En consecuencia, los intervalos de vida media ilustrativos (tiempo indicado en horas, h) del derivado de GLP-1 de la invención, ensayados en ratones db/db por administración s.c., son: 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, o 25-30 (horas).

40 En una quinta modalidad particular, la presente invención se refiere a un derivado de un péptido GLP-1 que tiene vida media terminal sustancialmente mejorada en roedores y en un modelo no roedor con relación a la liraglutida. La vida media terminal en roedores o en un modelo no roedor se mejora preferentemente al menos 3 veces con relación a la liraglutida. Alternativamente, la vida media terminal en un modelo no roedor se mejora al menos 6 veces con relación a la liraglutida, o el derivado de GLP-1 de la invención tiene una vida media in vivo de al menos 10 horas después de la administración i.v. a ratas.

45 En un segundo aspecto, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una estabilidad mejorada. En particular, tiene una estructura secundaria con un estiramiento alfa-helicoidal significativo. Se espera que las estructuras secundarias con estiramiento alfa-helicoidal significativo confieran estabilidad química, física y/o enzimática a la molécula en cuestión.

50 El contenido de alfa-hélice puede determinarse mediante el uso de espectroscopía de dicroísmo circular (DC), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 44. En modalidades particulares, (i) los espectros de DC de UV lejano se registran en soluciones 5 uM del compuesto en cuestión, preferentemente en Tris/ClO₄ 10 mM pH 8,0; (ii) se resta el valor de fondo del tampón; (iii) los datos se normalizan a elipticidad molar M⁻¹cm⁻¹ en base a la concentración de enlaces peptídicos; (iv) se extrae el valor de intensidad (épsilon delta) a 222 nm; (v) el contenido de alfa-hélices se calcula en base al valor de intensidad de (iv), se asume proporcionalidad y se usa para la conversión el hecho de que un valor de intensidad de -1 M⁻¹cm⁻¹ corresponde a una estructura con 10 % de alfa-hélices.

55 En una primera modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene un contenido de alfa-hélices superior al 20 %, preferentemente superior al 25 %, con mayor preferencia superior al 30 %, aún con mayor preferencia superior al 35 % y con la máxima preferencia superior al 36 %.

60 En una segunda modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene un contenido de alfa-hélices superior al 40 %, preferentemente superior al 45 %, con mayor preferencia superior al 50 %, aún con mayor preferencia superior al 55 % y con la máxima preferencia superior al 58 %.

65

En consecuencia, los intervalos ilustrativos del contenido de alfa-hélices de los derivados de GLP-1 de la invención son 20-60, 30-60, 40-60 y 50-60 (%).

5 En una tercera modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención es estable frente a la degradación química que se observa normalmente con la exendina-4 - especialmente la oxidación y la desamidación.

En una cuarta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención es estable química y físicamente a pH neutro, con la máxima preferencia en el intervalo 6-8.

10 En una quinta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene poca o ninguna tendencia a agregarse. La tendencia a la agregación se mejora significativamente preferentemente con relación a la tendencia a la agregación de la liraglutida cuando se evalúa en un ensayo de tioflavina.

15 En un tercer aspecto, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia aceptable, preferentemente alta (en el receptor). La potencia de un agente insulínico tal como el derivado de GLP-1 de la invención puede determinarse mediante el cálculo del valor de CE_{50} de la curva dosis-respuesta como se describe en el Ejemplo 40.

20 El término "agente insulínico" como se usa en la presente descripción, significa un derivado que es un agonista del receptor de GLP-1 humano, es decir, un derivado que estimula la formación de cAMP en un medio adecuado que contiene el receptor de GLP-1 humano (uno de tales medios se describe más abajo).

25 En modalidades particulares, (i) se usan células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresan el receptor de GLP-1 humano clonado, preferentemente BHK-467-12A, con mayor preferencia BHK-467-12A (tk-ts13); (ii) las células se cultivan en medios DMEM con la adición de 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (1 % Pen/Estrep), 5 % de suero fetal de ternera (FCS) y 0,5 mg/ml de Geneticina G-418 (Life Technologies), preferentemente al 5 % de CO_2 ; (iii) las células, preferentemente aproximadamente al 80 % de confluencia, se lavan dos veces en solución salina fosfato tamponada (PBS, por sus siglas en inglés); (iv) las células se cosechan con una solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético, tal como Versene; (v) las membranas plasmáticas se preparan a partir de las células mediante homogenización, preferentemente en tampón 1; (vi) el homogenizado se centrifuga, por ejemplo a 48,000 × g durante 15 min a 4 °C; y/o (vii) el sedimento se suspende por homogenización en el tampón 2; las etapas (vi) y (viii) se repiten preferentemente, por ejemplo una o dos veces más.

35 El ensayo funcional del receptor puede llevarse a cabo como se describe en el Ejemplo 40 mediante la medición del AMP cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) como respuesta a la estimulación por el agente insulínico. El cAMP formado se cuantifica preferentemente mediante el kit de cAMP AlphaScreen™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las incubaciones pueden llevarse a cabo en la mitad del área de placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 50 µl de tampón 3 (Tris-HCl 50 mM, HEPES 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,4) y con las adiciones siguientes: ATP 1 mM, GTP 1 µM, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,01 % de Tween-20, 0,1 % de BSA, preparación de membrana 6 µg, 15 µg/ml de perlasceptoras, 20 µg/ml de perlas donadoras incubadas previamente con biotini-cAMP 6 nM. Los derivados a evaluar para la actividad agonista se disuelven y diluyen preferentemente en tampón 3. GTP se prepara en el momento para cada experimento. La placa se incuba en la oscuridad con agitación lenta durante tres horas a temperatura ambiente, seguido por el recuento en el instrumento Fusion™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las curvas de concentración-respuesta se representan gráficamente para los derivados individuales y los valores estimados de CE_{50} mediante el uso de un modelo logístico de cuatro parámetros con Prism, preferentemente en la versión 4.0, o 5.0, (GraphPad, Carlsbad, CA).

50 En una primera modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el uso del ensayo de cAMP, inferior a 4,00, preferentemente inferior a 3,50, con mayor preferencia inferior a 3,00, aún con mayor preferencia inferior a 2,50, y con la máxima preferencia inferior a 2,00 (nM).

55 En una segunda modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el uso del ensayo de cAMP, inferior a 1,80, preferentemente inferior a 1,60, con mayor preferencia inferior a 1,40, aún con mayor preferencia inferior a 1,20, y con la máxima preferencia inferior a 1,00 (nM).

60 En una tercera modalidad particular, el derivado GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el uso del ensayo de cAMP, inferior a 0,80, preferentemente inferior a 0,60, con mayor preferencia inferior a 0,40, aún con mayor preferencia inferior a 0,20, y con la máxima preferencia inferior a 0,10 (nM).

65 En una cuarta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el uso del ensayo de cAMP, inferior a 0,090, preferentemente inferior a 0,080, con mayor preferencia inferior a 0,070, aún con mayor preferencia inferior a 0,060, y con la máxima preferencia inferior a 0,050 (nM).

En una quinta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE₅₀ en nM), determinada mediante el uso del ensayo de cAMP, inferior a 0,040, preferentemente inferior a 0,030, con mayor preferencia inferior a 0,020, y con la máxima preferencia inferior a 0,010 (nM).

5 En consecuencia, los intervalos ilustrativos de potencia (CE₅₀ en nM, según se determina mediante el uso del ensayo de cAMP) de los derivados de GLP-1 de la invención son 0,010-2,00, 0,010-1,80, 0,010-1,60, 0,010-1,40, 0,010-1,20, 0,010-1,00, 0,010-0,80, 0,010-0,60, 0,010-0,40, 0,010-0,30, 0,010-0,20, 0,010-0,10, y 0,010-0,90 (nM), preferentemente 0,010-0,40, 0,010-0,30, 0,010-0,20, 0,010-0,10, y 0,010-0,90 (nM).

10 En una sexta modalidad particular, para análogos con unión a la albúmina muy fuerte con afinidad de unión a la albúmina inferior a 100 nM, la potencia de GLP-1 es mejor que 3 micromolar y preferentemente la potencia es mejor que 1 micromolar en el ensayo de cAMP. Para derivados con unión a la albúmina fuerte con afinidad de unión a la albúmina inferior a 500 nM, la potencia de GLP-1 es mejor que 1 micro molar y preferentemente la potencia es mejor que 0,2 micromolar en el ensayo de cAMP.

15 En una séptima modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención puede unirse a la albúmina y al receptor de GLP-1 simultáneamente. Por ejemplo, el derivado de GLP-1 de la invención puede unirse al receptor de GLP-1 con una afinidad inferior a 100 nM, preferentemente inferior a 30 nM en presencia de albúmina al 2 %.

20 El derivado de GLP-1 de la invención puede tener, además, una afinidad por el receptor de GLP-1 que se reduce solo parcialmente cuando se compara la afinidad en presencia de concentración muy baja (por ejemplo, 0,005 % a 0,2 %) de albúmina humana con la afinidad en presencia de albúmina humana al 2 %. El cambio en la afinidad de unión en estas condiciones es preferentemente de menos de 50 veces, con mayor preferencia de menos de 30 veces y con la máxima preferencia de menos de 10 veces.

25 En un cuarto aspecto, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad alta de unión a la albúmina. La albúmina se refiere a la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés), y la afinidad puede determinarse como se describe en el Ejemplo 41.

30 Las afinidades de los derivados de GLP-1 para la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) pueden medirse mediante un ensayo de proximidad por centelleo competitivo (SPA), preferentemente mediante (i) la incubación de perlas de estreptavidina-SPA (tales como GE Healthcare RPNQ0009) con HSA biotinizada, por ejemplo, por 5 horas; (ii) el lavado de las perlas con tampón; (iii) el mezclado de las perlas mezcladas con un análogo de GLP-1 acilado etiquetado con ¹²⁵I, tal como N-épsilon26-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-
35 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8, ¹²⁵I-Tyr19,Arg34]GLP-1(7-37) o N-épsilon37-[2-(2-[2-(S)-4-(S)-4-(12-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil) butirilamino]dodecanoilamino) -4-carboxibutirilamino)-4-carboxibutirilamino]etoxi]etoxi)acetil][Aib8, ¹²⁵I-Tyr19, Glu22,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)-NH₂, preferentemente en un tampón que contiene Hepes 100 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Tween-20 al 0,025 %, pH 7,4; (iv) la transferencia de la mezcla a los pocillos de un contador de centelleo, tal como el Perkin Elmer Optiplat-96 6005290 (100 µl por pocillo), mediante el uso de volúmenes adecuados tales como 100 µl de una serie de diluciones adecuadas del derivado de GLP-1 a medir, preferentemente en el mismo tampón; (v) la centrifugación de las placas después de un tiempo de incubación adecuado tal como 20 horas, preferentemente con balanceo suave, con mayor preferencia a temperatura ambiente; (vi) el conteo de las placas, por ejemplo en un TopCounter; y/o (vii) la graficación de las cpm unidas como una función de la concentración del derivado de GLP-1. El valor CE₅₀
45 de la curva de competencia se usa preferentemente como una medida de la afinidad del derivado por la HSA. La afinidad de unión a la HSA puede expresarse, además, como K_d aparente (K_d para la Constante de Equilibrio de Disociación).

50 En una primera modalidad particular, la afinidad de unión a la albúmina (es decir, el valor CE₅₀ (en nM) de la curva de competencia, como se midió mediante el uso del ensayo del Ejemplo 41), es inferior a 2,000, preferentemente inferior a 1,500, con mayor preferencia inferior a 1,000, aún con mayor preferencia inferior a 800, y con la máxima preferencia inferior a 600 (nM).

55 En una segunda modalidad particular, la afinidad de unión a la albúmina (es decir, el valor CE₅₀ (en nM) de la curva de competencia, medida mediante el uso del ensayo del Ejemplo 41), es inferior a 500, preferentemente inferior a 400, con mayor preferencia inferior a 300, aún con mayor preferencia inferior a 200, y con la máxima preferencia inferior a 100 (nM).

60 En una tercera modalidad particular, la afinidad de unión a la albúmina del derivado de GLP-1 de la invención es inferior a 1 micromolar, preferentemente inferior a 500 nM, y aún con mayor preferencia inferior a 200 nM, o inferior aún a 100 nM.

65 En consecuencia, los intervalos ilustrativos de afinidad de unión a la albúmina (CE₅₀ en nM) del derivado de GLP-1 de la invención son: 1-2,000, 100-2,000, 200-2,000, 400-1,500, 600-1,500, y 800-1,500 (nM).

En un quinto aspecto, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad alta de unión al dominio extracelular N-terminal aislado del receptor de GLP-1 (nGLP-1R). La afinidad puede medirse como la capacidad de desplazar ¹²⁵I-Exendina-4(9-39) de la unión a nGLP-1R, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 42.

5 La proteína nGLP-1R puede prepararse como se describió por Runge y otros 2007 (In Biochemistry, volumen 46, pp. 5,830-5,840). La proteína se biotinila e inmoviliza, preferentemente sobre perlas SPA recubiertas de estreptavidina. El nGLP1R puede biotinilarse en un tampón adecuado tal como NaHCO₃ 0,1 M mediante el uso de 75 µg de BNHS (Sigma H1759) para 1 mg de proteína. El nGLP1R biotinilado se dializa posteriormente contra PBS preferentemente. Todos los reactivos y derivados se diluyen preferentemente en PBS, preferentemente con Tween 20 al 0,05 % v/v. 10 El ensayo de unión puede llevarse a cabo, por ejemplo, en OptiPlates de 96 pocillos (PerkinElmer 6005290) en un volumen final de 200 µl. Cada pocillo puede contener 2 mg de perlas de SPA recubiertas con estreptavidina (tales como PerkinElmer RPNQ007), 0,1 pmol de nGLP1R biotinilado, 50 pCi de ¹²⁵I-Exendina (9-39) y el péptido de prueba en concentraciones finales adecuadas, por ejemplo, que varían de 1,000 nM a 0,064 nM. Las placas se incuban en un agitador, preferentemente a RT (temperatura ambiente), o a 20 °C, y durante un período de tiempo 15 adecuado, por ejemplo, 3 horas. Las partículas de SPA pueden sedimentarse por centrifugación, por ejemplo, durante 10 min a 1,500 rpm, y se cuentan las placas, por ejemplo, en un TopCount-NXT (PerkinElmer).

La afinidad puede expresarse mediante un valor CI₅₀, que se lee a partir de la curva como la concentración del derivado de GLP-1 que desplaza 50 % de ¹²⁵I-Exendina-4(9-39) de la unión a nGLP-1R.

20 En una primera modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI₅₀/nM en el ensayo del Ejemplo 42, inferior a 1,500, preferentemente inferior a 1,000, aún con mayor preferencia inferior a 500, y con la máxima preferencia inferior a 400 (nM).

25 En una segunda modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI₅₀/nM en el ensayo del Ejemplo 42, inferior a 300, preferentemente inferior a 200, aún con mayor preferencia inferior a 150, y con la máxima preferencia inferior a 100 (nM).

30 En una tercera modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI₅₀/nM en el ensayo del Ejemplo 42, inferior a 80, preferentemente inferior a 60, aún con mayor preferencia inferior a 40, y con la máxima preferencia inferior a 20 (nM).

35 En una cuarta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI₅₀/nM en el ensayo del Ejemplo 42, inferior a 15, preferentemente inferior a 10, aún con mayor preferencia inferior a 8, y con la máxima preferencia inferior a 6 (nM).

40 En una quinta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI₅₀/nM en el ensayo del Ejemplo 42, inferior a 5,0, preferentemente inferior a 4,0, aún con mayor preferencia inferior a 3,0, y con la máxima preferencia inferior a 2,0 (nM).

45 En consecuencia, los intervalos ilustrativos de afinidad a nGLP-1R (CI₅₀ en nM) del derivado de GLP-1 de la invención son: 2-1,500, 2-1,000, 2-500, 2-300, 5-500, 10-500, y 2-10 (nM).

50 En este ensayo, la Exendina-4 se une al nGLP-1R con un valor de CI₅₀ de 5 nM, el GLP-1(7-37) se une al nGLP-1R con un valor de CI₅₀ de 1,120 nM y la liraglutida se une al nGLP-1R con un valor de CI₅₀ de 1,500 nM.

En una sexta modalidad particular, el derivado de GLP-1 de la invención se une al nGLP-1R con un valor de CI₅₀ menor que el de la liraglutida, con mayor preferencia con un valor de IC₅₀ inferior a 100 nM, y aún con mayor preferencia inferior a 10 nM, o inferior aún a 5 nM.

55 En un sexto aspecto, el término "protegido por DPP-IV" como se usa en la presente descripción por referencia a un polipéptido significa un polipéptido que se ha modificado químicamente para hacer que dicho derivado sea resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). Se conoce que la enzima DPP-IV en plasma se implica en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ejemplo, GLP-1, GLP-2, exendina-4, etcétera. Por lo tanto, se realiza un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos sensibles a la hidrólisis mediada por DPP-IV para reducir la velocidad de degradación por DPP-IV. 60

En una modalidad, un derivado de acuerdo con la invención es un derivado protegido por DPP-IV que es más resistente al DPP-IV que la liraglutida.

65 La resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente: Se incuban alícuotas del péptido (5 nmol) a 37 °C con 1 µl de dipeptidil aminopeptidasa IV

purificada, correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 µl de tampón trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de 5 µl de ácido trifluoroacético al 10 %, y los productos de degradación peptídica se separan y cuantifican mediante el uso de análisis por HPLC. Un método para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican sobre una columna Vydac C18 de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) de 250×4,6 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales, en etapas, de acetonitrilo en 0,1 % de ácido trifluoroacético (0 % de acetonitrilo durante 3 minutos, 0-24 % de acetonitrilo durante 17 minutos, 24-48 % de acetonitrilo durante 1 minuto) de acuerdo con Siegel y otros, Regul. Pept. 1999;79:93-102 y Mentlein y otros Eur. J. Biochem. 1993;214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden monitorearse mediante su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o a 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican mediante la integración de las áreas de sus picos con relación a las de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un péptido por la dipeptidil aminopeptidasa IV se estima a tiempos de incubación que resulten en menos del 10 % de hidrólisis del péptido.

Alternativamente, la resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente: Se incuban alícuotas del péptido (4 nmol) a 37 °C con 10,9 mU de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada durante 22 horas, en 40 µl de tampón Tris-HCl 0,085 M, pH 8,0, en presencia o ausencia de albúmina sérica humana al 1,6 %. Después de 0, 4 y 22 horas, se toman muestras de 10 µl y se terminan las reacciones enzimáticas mediante la mezcla con 100 µl de ácido trifluoroacético al 1 %. Los productos de degradación del péptido se separan y cuantifican mediante el uso de análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican en una columna Agilent Zorbax 300SB-C18 (partículas de 5 µm) de 150 × 2,1 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min con un gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0,1 % a 100 % de acetonitrilo con TFA al 0,07 % en 30 minutos. Los péptidos y sus productos de degradación se monitorean mediante su absorbancia a 214 nm, y se cuantifican mediante la integración de las áreas de sus picos. La estabilidad de un péptido contra la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina como el área de pico del péptido intacto con relación a la suma de las áreas de pico del péptido intacto y el producto de degradación que carece de los dos aminoácidos aminotermiales después de la escisión.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de un péptido GLP-1 que puede formularse en partículas adecuadas para la administración pulmonar (suministro). Esto puede ser con respecto a los aspectos físicos o químicos que son útiles para una formulación pulmonar. Alternativamente, los derivados son estables frente a la degradación por enzimas en las vías respiratorias y los pulmones.

En modalidades de la invención, se logra una combinación de una o más de las características anteriores.

Enlace a la albúmina

El término "porción de unión a la albúmina" como se usa en la presente descripción significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina sérica humana. El residuo de unión a la albúmina unido al polipéptido terapéutico tiene típicamente una afinidad de unión a la albúmina que es inferior a 1 micromolar, preferentemente inferior a 500 nM, y aún con mayor preferencia inferior a 200 nM o aún inferior a 100 nM.

Se conoce un intervalo de residuos de unión a la albúmina entre las porciones lipófilas lineales y ramificadas que contienen de 4-40 átomos de carbono que tienen un grupo ácido distal.

El término "conector hidrófilo" como se usa en la presente descripción significa un espaciador que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina con una porción química que comprende al menos 5 átomos que no son de hidrógeno, donde 30-50 % de estos son N u O.

En las fórmulas más abajo los enlaces terminales de los grupos unidos deben considerarse como enlaces de unión y no que terminan en grupos metileno a menos que se indique lo contrario.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con la presente invención que está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 25 mg/ml, y en donde dicha formulación tenga un pH de 3,0 a 9,0. La formulación puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizadores y tensioactivos.

Formulación

En una modalidad de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión.

En una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa.

El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, en la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes del uso.

- 5 En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por atomización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un derivado de acuerdo con la presente invención, y un tampón, en donde dicho derivado está presente en una concentración de 0,1 mg/ml o superior, y en donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0.

15 En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5. En otra modalidad de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0. En otra modalidad, la formulación farmacéutica es de 8,0 a 8,5.

20 En una modalidad de la invención, cada dosis administrada contiene de 0,01 mg - 10 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene más de 0,05 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene más de 0,1 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 10 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 9 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 8 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 7 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 6 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene hasta 5 mg de derivado activo. En una modalidad, la dosis administrada contiene de 0,2 mg a 5 mg de derivado activo.

30 En una modalidad adicional de la invención, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

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

50 En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende, además, un agente isotónico. En una modalidad adicional de la invención, el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o sus mezclas. En una modalidad, el agente de isotonicidad es propilenglicol. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. En una modalidad, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una modalidad, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad usada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizadores alcanzados mediante el uso de los métodos de la invención. En una modalidad, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar es entre

aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una modalidad de la invención adicional, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una modalidad de la invención adicional, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una modalidad de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 5 mg/ml a 7 mg/ml. En una modalidad de la invención adicional, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una modalidad de la invención adicional, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Edición 19, 1995.

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

En una modalidad de la invención adicional, la formulación comprende, además, un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Edición 19, 1995.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes con actividad terapéutica incluyen un polipéptido que posiblemente exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas.

Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida, que una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, después de la preparación, se empaca para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca ya sea mediante secado por congelación (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por atomización (ver Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ta Edición; Longman Scientific and Technical, Essez, R.U.), pp. 491-676; Broadhead y otros (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler y otros (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de ese polipéptido, lo que resulta en la 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 la composición farmacéutica que contiene polipéptidos se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, además, una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden presentarse en sus formas de base libre, todos pueden presentarse en sus formas de sal, o algunos pueden presentarse en sus formas de base libre, mientras otros se presentan en sus formas de sal. En una modalidad, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o sus mezclas) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas) o combinaciones de estos estereoisómeros, puede presentarse en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. En una modalidad, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención pueden formularse, además, con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que produce el efecto deseado de disminución de la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En una modalidad adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración, que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

En una modalidad adicional de la invención, puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a metionina sulfóxido cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina en el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina resulta en una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o sus combinaciones. La cantidad que debe añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de metionina sulfóxido sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de metionina sulfóxido. Generalmente, esto puede alcanzarse mediante la adición de metionina de manera que la relación entre la metionina añadida y los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende, además, un estabilizador seleccionado del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular.

En una modalidad adicional de la invención, el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de estos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y sales diferentes (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, agentes estabilizadores adicionales, que mejoran adicionalmente la estabilidad de un polipéptido activo terapéuticamente en estas.

Los agentes estabilizadores de interés particular para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada a la congelación-descongelación o al cizallamiento mecánico.

En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende, además, un tensioactivo. En otra modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes. El término "Tensioactivo" como se usa en la presente descripción se refiere a cualesquiera moléculas o iones que se comprenden de una parte soluble en agua (hidrófila), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipófilo). Los tensioactivos se acumulan preferentemente en las interfaces, en las que la parte hidrófila se orienta hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase oleosa o hidrófoba (es decir, vidrio, aire, aceite, etcétera). La concentración a la que los tensioactivos comienzan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Además, los tensioactivos disminuyen la tensión superficial de un líquido. Los tensioactivos se conocen, además, como compuestos anfipáticos. El término "Detergente" es un sinónimo usado para los tensioactivos en general.

Los tensioactivos aniónicos pueden seleccionarse del grupo de: Ácido quenodesoxicólico, sal sódica del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshdrocólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, docusato de sodio, ácido glicoenodesoxicólico sodio, hidrato del ácido glicólico, ácido monohidrato glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal disódica 3-sulfato del ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, sal sódica de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, litio dodecil sulfato, lugol, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetanosulfonato de sodio, hidrato colato de sodio, bilis de buey o de oveja, hidrato colato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico monohidratada, sal disódica 3-sulfato del ácido taurolítocólico, sal sódica del ácido tauroursodesoxicólico, dodecilsulfato de Trizma®, DSS (docusato de sodio, CAS registro núm. [577-11-7]), docusato de calcio, CAS registro núm. [128-49-4]), docusato de potasio, CAS registro núm. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), dodecilsulfato de sodio, decilfosfocolina (FOS-colina-12), decilfosfocolina (FOS-colina-10), nonilfosfocolina (FOS-colina-9), ácido dipalmitoilfosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico

Los tensioactivos catiónicos pueden seleccionarse del grupo de: Bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetrachloriodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiodecilamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, polioxietileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio, y/o bromuro de trimetil (tetradecil)amonio.

65

Los tensioactivos no iónicos pueden seleccionarse del grupo de: BigCHAP, bis(polietilenglicol bis[imidazoilcarbonil]), copolímeros en bloque como óxido de polietileno/óxido de polipropileno, copolímeros en bloque tales como, poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, decaetilenglicol monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, alquil-poliglucósidos, aceite de ricino etoxilado, heptaetilenglicol monodecil éter, heptaetilenglicol monododecil éter, heptaetilenglicol monotetradecil éter, hexaetilenglicol monododecil éter, hexaetilenglicol monohexadecil éter, hexaetilenglicol monoctadecil éter, éter, hexaetilenglicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, nonaetilenglicol monododecil éter, N-nonanoil-N-metilglucamina, nonanoil-N-metilglucamina, octaetilenglicol monodecil éter, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monohexadecil éter, octaetilenglicol monoctadecil éter, octaetilenglicol monotetradecil éter, octil-β-D-glucopiranosido, pentaetilenglicol monodecil éter, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monohexil éter, pentaetilenglicol monoctadecil éter, pentaetilenglicol monooctil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polietilenglicol éter W-1, polioxietileno 10 tridecil éter, estearato de polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, polioxietileno 20 oleil éter, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, polioxietileno bis (imidazolil, carbonil), estearato de polioxietileno 25 propilenglicol, saponina de corteza de Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, Tipo 15-S-12, Tergitol, Tipo 15-S-30, Tergitol, Tipo 15-S-5, Tergitol, Tipo 15-S-7, Tergitol, Tipo 15-S-9, Tergitol, Tipo NP-10, Tergitol, Tipo NP-4, Tergitol, Tipo NP-40, Tergitol, Tipo NP-7, Tergitol, Tipo NP-9, tetradecil-β-D-maltósido, tetraetilenglicol monodecil éter, tetraetilenglicol monododecil éter, tetraetilenglicol monotetradecil éter, trietilenglicol monodecil éter, trietilenglicol monododecil éter, trietilenglicol monohexadecil éter, trietilenglicol monoctadecil éter, trietilenglicol monotetradecil éter, Triton CF-21, Triton CF- 32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X- 200, Triton X-207, Triton® X-100, Triton® X-114, solución de Triton® X-165, solución de Triton® X-305, Triton® X-405, Triton X-45, Triton X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos, y/o n-undecil β-D-glucopiranosido.

Los tensioactivos zwitteriónicos pueden seleccionarse del grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)-propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alkil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonato, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilosfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(decildimetil-amonio)propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(octildimetil-amonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidil serina), gliceroglicolípidos (galactopiranosido), derivados alquil, alcoxil (alquil éter), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, lauroil y miristoil derivados de la lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^{beta}-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados de cadena lateral acilados de lisina o arginina, derivados N^{beta}-acilados de dipéptidos que comprendan cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^{beta}-acilado de un tripéptido que comprenda cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sus sales C₆- C₁₂ (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos aniónicos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ejemplo ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), o mezclas de estos.

El término "alquil-poliglucósidos" como se usa en la presente descripción se refiere a una cadena C₅₋₂₀-alquilo, -alquenilo o -alquinilo lineal o ramificado que se sustituye con una o más porciones glucósido tales como maltósido, sacárido, etcétera. Las modalidades de estos alquil-poliglucósidos incluyen C₆₋₁₈-alquil-poliglucósidos. Las modalidades específicas de estos alquil-poliglucósidos incluyen las cadenas de número par de carbono, tales como las cadenas alquilo C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Las modalidades específicas de las porciones glucósido incluyen piranosido, glucopiranosido, maltósido, maltotriósido y sacarosa. En modalidades de la invención, menos de 6 porciones glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 5 porciones glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 4 porciones glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 3 porciones glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 2 porciones glucósido se unen al grupo alquilo. Modalidades específicas de alquil-poliglucósidos son alquil-glucósidos como n-decil β-D-glucopiranosido, decil β-D-maltopiranosido, dodecil β-D-glucopiranosido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, tetradecil β-D-glucopiranosido, decil β-D-maltósido, hexadecil β-D-maltósido, decil β-D-maltotriósido, dodecil β-D-maltotriósido, tetradecil β-D-maltotriósido, hexadecil-β-D-maltotriósido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Edición 19, 1995.

En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende, además, inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y benzamidina HCl, pero pueden usarse, además, otros inhibidores de proteasa disponibles comercialmente. El uso de un inhibidor de proteasa es útil particularmente en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

Es posible que puedan presentarse otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y las mucosas, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

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

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, tabletas, tabletas recubiertas, goma de mascar, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizadores, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones transformadoras in situ, por ejemplo, gelificación in situ, colocación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión, e implantes. Las composiciones de la invención pueden combinarse adicionalmente, o unirse a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador farmacéutico, sistema de administración de fármaco y sistema de administración de fármaco avanzado para mejorar adicionalmente la estabilidad del derivado de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar la obediencia del paciente o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, pero no se limitan a, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(vinil alcohol), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de estos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas copoliméricos en bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de estos, fase L2 y dispersiones de esta, bien conocidas por los expertos en la técnica de comportamiento de fase en sistemas de lípidos y agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de estos, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar de derivados de la presente invención, mediante el uso de, por ejemplo, un inhalador de dosis fija, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones de la actual invención son útiles específicamente en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero no limitadas a, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida parenteral (ambos sistemas conducen a una reducción en muchas veces de la cantidad de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Aún con mayor preferencia, son sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada útiles son los hidrogeles, los geles oleaginosos, los cristales líquidos, las micelas poliméricas, las microesferas y las nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a presión alta, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled

Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences volumen 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una lapicera. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o una suspensión o un polvo para la administración del derivado de la presente invención en forma de un aerosol líquido o de polvo nasal o pulmonar. Como aún una opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el derivado de la invención pueden adaptarse, además, a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

Los derivados de la presente invención pueden administrarse por vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco mediante el uso de cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para la administración pulmonar de fármacos. Los ejemplos de estos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generación de aerosoles para la administración de fármacos pulmonares, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis fija o inhaladores de polvo seco (consultar Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basado en la metodología de análisis estandarizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro geométrico equivalente de una partícula esférica estándar de referencia de densidad unitaria (1 g/cm^3). En el caso más simple, para partículas esféricas, d_a se relaciona con un diámetro de referencia (d) como una función de la raíz cuadrada de la relación de densidad como se describió por:

Se producen modificaciones de esta relación para partículas no esféricas (consultar Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" están bien descritos y son conocidos en la técnica (consultar Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R y representan una medida del valor medio de la distribución de tamaño de partículas aerodinámicas. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) y el diámetro aerodinámico de masa media eficaz (MMEAD) se usan indistintamente, son parámetros estadísticos, y describen empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol en relación con su potencial para depositarse en los pulmones, independientemente de su forma, tamaño, o densidad reales (consultar Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El MMAD se calcula normalmente a partir de la medición hecha con impactadores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de la partícula en el aire. En una modalidad adicional, la formulación podría aerosolizarse mediante cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como nebulización, para alcanzar un MMAD de las partículas de aerosol menor de $10 \mu\text{m}$, con mayor preferencia entre $1\text{-}5 \mu\text{m}$, y con la máxima preferencia entre $1\text{-}3 \mu\text{m}$. El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más efectivo para el suministro del fármaco a la zona profunda del pulmón, donde la proteína se absorbe óptimamente (consultar Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

El depósito en la zona profunda del pulmón de las formulaciones pulmonares que comprenden el derivado de la presente invención puede optimizarse opcionalmente, además, mediante el uso de modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero sin limitarse a: flujo de inhalación lento (por ejemplo, 30 L/min), retención de la respiración y tiempo de actuación.

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

El término "estabilidad física" de la formulación de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados inactivos biológicamente y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estrés termomecánico y/o interacción con las interfaces y las superficies que son desestabilizadores, tales como las superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer la formulación vertida en contenedores adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a estrés mecánico o físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz nítida enfocada con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica inestable físicamente con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación puede evaluarse mediante mediciones simples de turbidez bien conocidas por los expertos. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas puede evaluarse,

además, mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferencialmente a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura proteica es la tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y tal vez también de otras configuraciones de proteínas, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína fibrilar. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

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

El término "estabilidad química" de la formulación de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con posible menor potencia biológica y/o aumento potencial de propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína natural. Pueden formarse diversos productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del entorno al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química puede probablemente no evitarse completamente y a menudo se observan cantidades aumentadas de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación de proteínas como es bien conocido por el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que se hidroliza el grupo amida de la cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de dímeros, oligómeros y productos de degradación de polímeros unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en diversos momentos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (a menudo la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación en dependencia del tamaño de la molécula y/o la carga mediante el uso de diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por lo tanto, como se señaló anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

En una modalidad de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra modalidad de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Aún en una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la presente invención es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

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

En una modalidad, un derivado de acuerdo con la invención se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

En otra modalidad, se usa un derivado de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

5 En otra modalidad, un derivado de acuerdo con la invención se usa para la preparación de un medicamento para disminuir el consumo de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de las células β y la masa de células β , y/o para restablecer a las células β la sensibilidad a la glucosa.

10 El tratamiento con un derivado de acuerdo con la presente invención puede combinarse, además, con una segunda o más sustancias activas farmacológicamente, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes o asociados con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: Insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo lipídico tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores HMG CoA (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozilo, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores beta 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 de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamilo, y bloqueadores α tales como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de PYY, agonistas del receptor de Y2, agonistas del receptor de Y4, agonistas mixtos del receptor de Y2/Y4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas del TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas del CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas del CRF BP (proteína de unión al factor de liberación de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas $\beta 3$, oxintomodulina y análogos, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona de crecimiento, compuestos de liberación de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteínas desacopladoras 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas TR β ; antagonistas de histamina H3, agonistas o antagonistas del polipéptido inhibidor gástrico (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina.

40 El tratamiento con un derivado de acuerdo con esta invención puede combinarse, además, con cirugía, una cirugía que influya en los niveles de glucosa y/o homeostasis lipídica, tal como la banda gástrica o la derivación gástrica.

Debe entenderse que cualquier combinación adecuada de los derivados de acuerdo con la invención con uno o más de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o más sustancias activas farmacológicamente adicionales se consideran dentro del alcance de la presente invención.

45 Método de fabricación

50 En dependencia de la secuencia, los análogos de esta invención pueden producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido, y que es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante se recupera del cultivo.

55 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contengan los suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células puede recuperarse después del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteináceos del sobrenadante o del filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, en dependencia del tipo de péptido en cuestión.

60 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido terapéutico puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, obtenida mediante la preparación de una biblioteca genómica o de ADNc y mediante la selección de secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido por hibridación mediante el uso de sondas de oligonucleótidos sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La

secuencia de ADN que codifica el polipéptido puede prepararse, además, sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1,859-1,869, o el método descrito por Matthes y otros, *EMBO Journal* 3 (1984), 801-805. La secuencia de ADN puede prepararse, además, por la reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de cebadores específicos, por ejemplo como se describió en la patente de Estados Unidos núm. 4,683,202 o Saiki y otros, *Science* 239 (1988), 487-491.

La secuencia de ADN puede insertarse en cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que se va a introducir. De este modo, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido se une operativamente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas ya sea homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una diversidad de células huésped son bien conocidos en la técnica (consultar, por ejemplo, Sambrook y otros, más arriba).

La secuencia de ADN que codifica el péptido puede, además, si es necesario, conectarse operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede comprender, además, una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

El vector puede comprender, además, un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que confiera resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

Para dirigir un péptido parental de la presente invención en la ruta secretora de las células huésped, puede proporcionarse una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o pre secuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la asociada normalmente con el péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína secretada. Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el presente péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (consultar, por ejemplo, Sambrook y otros, más arriba).

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

Aspectos adicionales

1. Un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1 7-37 (sec. con núm. de ident.: 1) modificada que tiene:

i) un total de 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye

a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de la sec. con núm. de ident.: 1 y

b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de la sec. con núm. de ident.: 1,

ii) opcionalmente, una extensión C terminal de 1 residuo de aminoácido,

iii) opcionalmente, el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de la sec. con núm. de ident.: 1 puede estar ausente, y

iv) opcionalmente un grupo amida C-terminal,

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, en la posición 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.

5 2. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 que comprende una secuencia de GLP-1 7-37 (sec. con núm. de ident.: 1) modificada que tiene:

i) un total de 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye

10

a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de la sec. con núm. de ident.: 1 y
b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de la sec. con núm. de ident.: 1,

15

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, en la posición 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.

20

3. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1, en donde el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de la sec. con núm. de ident.: 1 está ausente, y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada en una posición equivalente a las posiciones 18, 23, 31, 34 o 36 de la sec. con núm. de ident.: 1
y en donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 30 aminoácidos.

25

4. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 que tiene una extensión C terminal de 1 residuo de aminoácido de longitud y en donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 32 aminoácidos.

5. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 que tiene un grupo amida C-terminal.

30

6. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5 que tiene la secuencia de fórmula (I)

Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-R fórmula (I) (sec. con núm. de ident.: 2),

35

que tiene preferentemente la secuencia de fórmula (I') que es idéntica a la fórmula (I) excepto por tener Leu en la posición 20,

en donde

40

Xaa₇ - Xaa₈ es L-histidina-Aib, desamino-histidina-alanina o desamino-histidina-Aib Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu tal como alfa,alfa-dimetil-Glu

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;

Xaa₂₀ es Leu o Lys

45

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;

Xaa₂₄ es Ala o Asn

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys o Arg, preferentemente Ala, Glu o Arg;

50

Xaa₃₁ es Trp, Cys o Lys;

Xaa₃₃ es Val, Cys o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Cys, Glu, Asn o Arg;

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg o Lys,

55

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Cys, Lys o está ausente

Xaa₃₈ es Lys, Glu o está ausente;

R es amida o está ausente

60

siempre y cuando si Xaa₃₇ está ausente, entonces Xaa₃₈ también está ausente,

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, en la posición 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.

65

7. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5 que tiene la secuencia de fórmula (II)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala- Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-
Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-R fórmula (II) (sec. con núm. de ident.: 3)

5 en donde

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

10 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, 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;

Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;

Xaa₃₃ es Val o Lys;

15 Xaa₃₄ es Lys, Glu o Arg;

Xaa₃₅ es Gly o Aib;

Xaa₃₆ es Arg o Lys,

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Lys o está ausente,

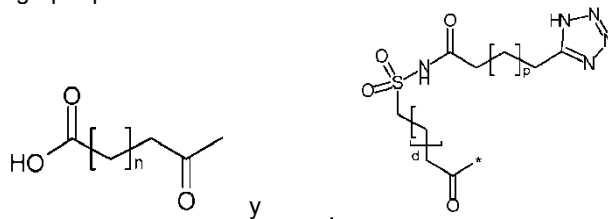
Xaa₃₈ es Lys, Glu o está ausente,

20 R es amida o está ausente

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, en la posición 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.

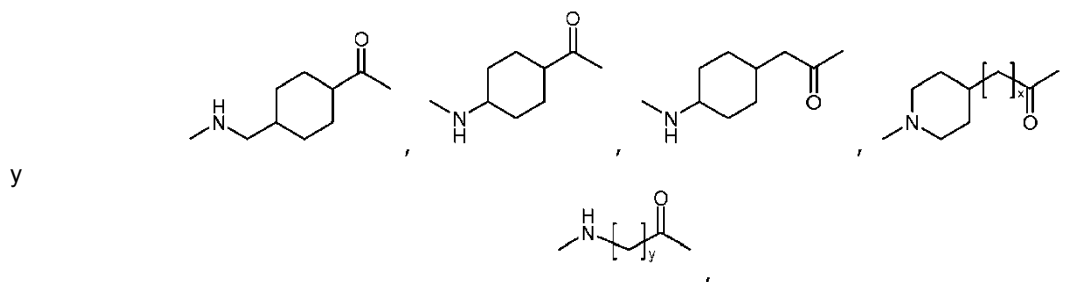
25 8. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-7, en donde al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-

en donde A- se selecciona del grupo que consiste en



en donde n se selecciona del grupo que consiste en 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se selecciona del grupo que consiste en 10, 11, 12, 13 y 14, y d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

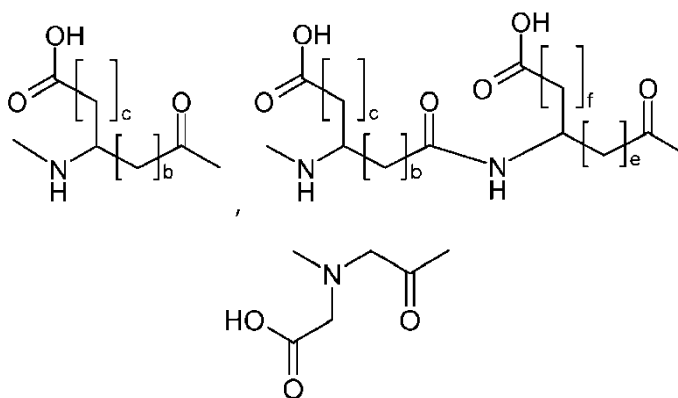
35 -B- se selecciona del grupo que consiste en



en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, e y se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

-C- se selecciona del grupo que consiste en

45



y

5 en donde b y e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2, y c y f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2 siempre y cuando b es 1 o 2 cuando c es 0, o b es 0 cuando c es 1 o 2, y e es 1 o 2 cuando f es 0, o e es 0 cuando f es 1 o 2, y

-D- se une a dicho residuo de aminoácido y es un conector.

10 9. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-55, en donde el residuo de aminoácido derivatizado es lisina.

15 10. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-9, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

20 11. Un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-9 para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

25 La secuencia de aminoácidos del GLP-1(7-37) humano se incluye en el Listado de Secuencias como sec. con núm. de ident.: 1, y las sec. con núms. de ident.: 2 y 3 son sus derivados de acuerdo con la invención. En el Listado de Secuencias, la numeración comienza con el residuo de aminoácidos núm. 1. En consecuencia, por ejemplo, la posición 1 de la sec. con núm. de ident.: 1 es equivalente a la posición 7 de GLP-1(7-37) (His), la posición 16 de la sec. con núm. de ident.: 1 es equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-37) (Gly), y la posición 20 de la sec. con núm. de ident.: 1 es equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (Lys) - y viceversa para las otras posiciones y las otras secuencias.

30 En consecuencia, la invención proporciona, además, en la reivindicación 1 de las solicitudes de prioridad, un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1(7-37) modificada que tiene:

i) un total de 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la sec. con núm. de ident.: 1, que incluye

35 a) un residuo Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-37) (posición 16 de la sec. con núm. de ident.: 1) y

b) un residuo Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (posición 20 de la sec. con núm. de ident.: 1),

40 ii) opcionalmente, una extensión C terminal de 1 residuo de aminoácido,

45 iii) opcionalmente el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (posición 31 de la sec. con núm. de ident.: 1) puede estar ausente, y

iv) opcionalmente un grupo amida C-terminal,

50 el cual se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de GLP-1(7-37) (posición 12, 14, 17, 24, 25, 28, 30 o 31, respectivamente, de la sec. con núm. de ident.: 1). La invención proporciona, además, derivados de GLP-1, sus métodos y usos, y composiciones farmacéuticas con su contenido correspondiente a cualquiera de las reivindicaciones y modalidades particulares de acuerdo con la invención, en las que se han realizado enmiendas en la numeración de la posición correspondiente como se explicó anteriormente, y se muestran anteriormente para el derivado de GLP-1 de la reivindicación 1 de las solicitudes de prioridad.

Aspectos adicionales

- 5 1. Un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1 7-37 (sec. con núm. de ident.: 1) modificada que tiene:
- i) un total de 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye
- 10 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de la sec. con núm. de ident.: 1 y
b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de la sec. con núm. de ident.: 1,
- ii) opcionalmente, una extensión C terminal de 1 residuo de aminoácido,
15 iii) opcionalmente, el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de la sec. con núm. de ident.: 1 puede estar ausente, y
iv) opcionalmente un grupo amida C-terminal,
- y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente 18, 23, 31,
20 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.
- En modalidades se han modificado un máximo de 6 aminoácidos. En modalidades se han modificado un máximo de 5 aminoácidos. En modalidades se han modificado un máximo de 4 aminoácidos. En modalidades se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En modalidades se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En
25 modalidades se ha modificado un máximo de 1 aminoácido. En modalidades se ha añadido un aminoácido en el terminal C. En modalidades se ha eliminado un aminoácido en el C-terminal. En modalidades hay un grupo amida C-terminal.
2. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 que comprende una secuencia de GLP-1 7-37 (sec. con núm. de ident.: 1) modificada que tiene:
- 30 i) un total de 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye
- 35 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de la sec. con núm. de ident.: 1 y
b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de la sec. con núm. de ident.: 1,
- y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente 18, 23, 31,
40 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.
3. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1, en donde el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de la sec. con núm. de ident.: 1 está ausente, y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a las posiciones 18, 23, 31, 34 o 36 de sec.
45 con núm. de ident.: 1, y en donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 30 aminoácidos.
4. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 que tiene una extensión C terminal de 1 residuo de aminoácido de longitud y en donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 32 aminoácidos.
- 50 5. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 que tiene un grupo amida C-terminal.
6. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5, que tiene 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye las sustituciones en
55 las posiciones 22 y 26.
7. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-6, que tiene una sustitución seleccionada en una posición del grupo de posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 34 y 37 en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1.
60
8. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 7, que tiene una sustitución seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34, Asn34, Cys37 y Lys37.

9. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 7-8, que tiene una sustitución seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7, Aib8, Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
- 5 10. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 7-9, que tiene una sustitución seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8.
11. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5, que tiene 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye las sustituciones en las posiciones 22 y 26.
- 10 12. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5 y 11, que tiene dos sustituciones en una posición seleccionada del grupo de posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 34 y 37 en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1.
- 15 13. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 11-12, que tiene dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34, Asn34, Cys37 y Lys37.
- 20 14. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 11-13, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8 y una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
- 25 15. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 11-14, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8, y una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
- 30 16. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5, que tiene 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye las sustituciones en las posiciones 22 y 26.
- 35 17. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5 y 16, que tiene tres sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 34 y 37 en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1.
- 40 18. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 16-17, que tiene tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34, Asn34, Cys37 y Lys37.
- 45 19. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 16-18, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8, y dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
- 50 20. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 16-19, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8, y dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
- 55 21. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5, que tiene 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-37 de sec. con núm. de ident.: 1, que incluye las sustituciones en las posiciones 22 y 26.
- 60 22. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5 y 21, tiene cuatro sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 34 y 37.
- 65 23. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 21-22, que tiene cuatro sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34, Asn34, Cys37 y Lys37.
24. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 21-23, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8 y tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.
25. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 21-24, que tiene una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en desaminoHis7 y Aib8 y tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33, Lys34 y Lys37.

26. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-25, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 18.
- 5 27. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-26, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 23.
28. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-26, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 31.
- 10 29. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-26, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 34.
30. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-26, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 36.
- 15 31. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-26, que se ha pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 37.
- 20 32. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-31, que se ha pegilado.
33. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el aminoácido en una posición equivalente a la posición 37 de la sec. con núm. de ident.: 1 se ha sustituido con Lys, y cuyo residuo de Lys se pega o se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina.
- 25 34. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-33, que se ha derivatizado con un residuo de unión a la albúmina.
- 30 35. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-34, que tiene la secuencia de fórmula (I)
- Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-R
- 35 fórmula (I) (sec. con núm. de ident.: 2), preferentemente la Fórmula (I') que es idéntica a la Fórmula (I) excepto que tiene un Leu en la posición 20
- en donde
- 40 Xaa₇ - Xaa₈ es L-histidina-Aib, desamino-histidina-alanina o desamino-histidina-Aib Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu tal como alfa,alfa-dimetil-Glu
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₀ es Leu o Lys
- 45 Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala o Asn
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys o Arg, preferentemente Ala, Glu o Arg;
- Xaa₃₁ es Trp, Cys o Lys;
- 50 Xaa₃₃ es Val, Cys o Lys;
- Xaa₃₄ es Lys, Cys, Glu, Asn o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly o Aib;
- Xaa₃₆ es Arg o Lys,
- Xaa₃₇ es Gly, Aib, Cys, Lys o está ausente
- 55 Xaa₃₈ es Lys, Glu o está ausente;
- R es amida o está ausente
- siempre y cuando si Xaa₃₇ está ausente, entonces Xaa₃₈ también está ausente, y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con núm. de ident.: 1.
- 60 36. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-35, que tiene la secuencia de fórmula (II)
- 65

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala- Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-
Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-R F6rmula (II) (sec. con n6m. de ident.: 3)

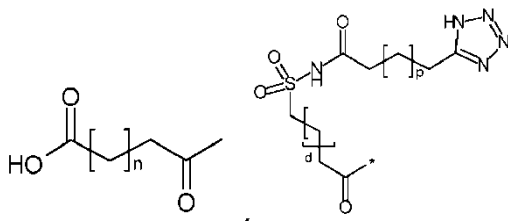
en donde

- 5 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, 6cido (1-aminociclopropil) carbox6lico, 6cido (1-aminociclobutil) carbox6lico, 6cido (1-aminociclopentil) carbox6lico, 6cido (1-aminociclohexil) carbox6lico, 6cido (1-aminocicloheptil) carbox6lico, o 6cido (1-aminociclooctil) carbox6lico;
- 10 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
Xaa₃₀ es Ala, Glu o Arg;
Xaa₃₃ es Val o Lys;
Xaa₃₄ es Lys, Glu o Arg;
Xaa₃₅ es Gly o Aib;
- 15 Xaa₃₆ es Arg o Lys,
Xaa₃₇ es Gly, Aib, Lys o est6 ausente
Xaa₃₈ es Lys, Glu o est6 ausente;
R es amida o est6 ausente
- 20 y que se derivatiza con un residuo de uni6n a la alb6mina o se pegila en una posici6n seleccionada de una posici6n equivalente a la posici6n 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con n6m. de ident.: 1, preferentemente, en la posici6n 18, 23, 31, 34, 36 o 37 de la sec. con n6m. de ident.: 1.
- 25 37. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-36, en donde Xaa₃₈ est6 ausente.
38. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-37, en donde Xaa₃₇ y Xaa₃₈ est6n ausentes.
- 30 39. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-38, en donde Xaa₃₇ y Xaa₃₈ est6n ambas ausentes, y Xaa₃₆ es Xaa₃₆-amida.
40. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 3 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₇ es desaminohistidina.
- 35 41. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 4 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₇ es desaminohistidina.
42. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 5 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₇ es desaminohistidina.
- 40 43. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 6 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₇ es desaminohistidina.
44. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 3 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₈ es Aib.
- 45 45. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 4 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₈ es Aib.
46. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 5 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₈ es Aib.
- 50 47. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-39, en donde 6 amino6cidos se sustituyen en comparaci6n con la secuencia 7-37 de sec. con n6m. de ident.: 1 y donde Xaa₈ es Aib.
48. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-47, en donde Xaa₇ es desaminohistidina.
- 55 49. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-48, que comprende un espaciador hidr6filo entre la secuencia de GLP-1 modificada y uno o m6s residuo(s) de uni6n a la alb6mina.
- 60 50. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 49, en donde el espaciador hidr6filo es una porci6n de oligoetilenglicol no ramificada con grupos funcionales apropiados en ambos terminales que forman un puente entre un grupo amino de la secuencia de GLP-1 modificada y un grupo funcional del residuo de uni6n a la alb6mina.
- 65 51. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-59, que se ha derivatizado con un residuo de uni6n a la alb6mina.

52. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-51, en donde al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-

en donde A- se selecciona del grupo que consiste en

5



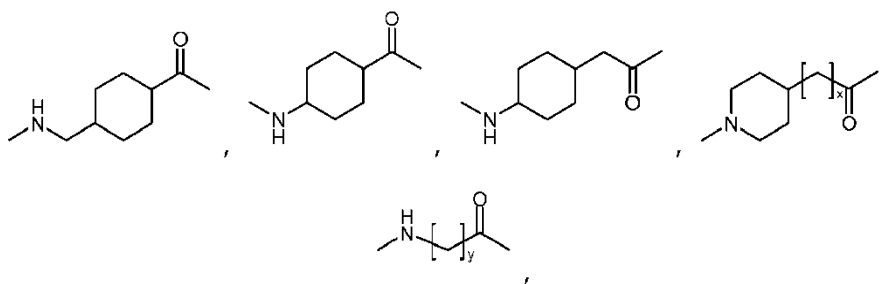
tetrazol sin sulfonamida,

10 y en donde n se selecciona del grupo que consiste en 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se selecciona del grupo que consiste en 10, 11, 12, 13 y 14, y d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

-B- se selecciona del grupo que consiste en

15

y



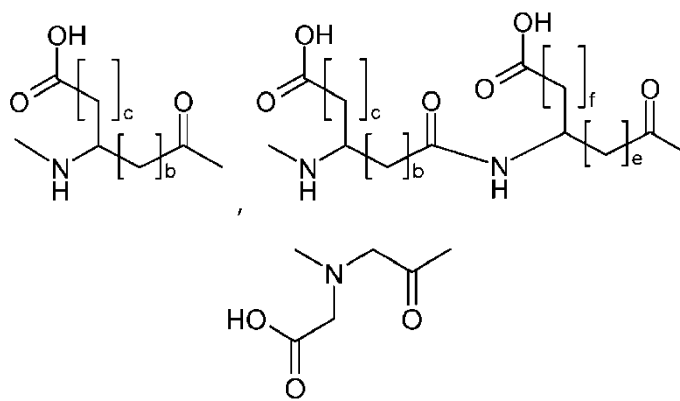
20

en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, e y se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

-C- se selecciona del grupo que consiste en

25

y



30

en donde b y e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2, y c y f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2 siempre y cuando b es 1 o 2 cuando c es 0, o b es 0 cuando c es 1 o 2, y e es 1 o 2 cuando f es 0, o e es 0 cuando f es 1 o 2, y

-D- se une a dicho residuo de aminoácido y es un conector.

35

53. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 52, en donde un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-

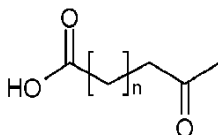
54. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-53, en donde el residuo de aminoácido derivatizado comprende un grupo amino.

55. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-54, en donde el residuo de aminoácido derivatizado comprende un grupo amino primario en una cadena lateral.

5 56. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-55, en donde el residuo de aminoácido derivatizado es lisina.

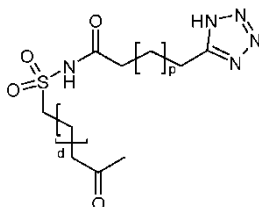
57. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-56, en donde se derivatiza solo un residuo de aminoácido.

10 58. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-57, en donde A- es



15 59. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-58, en donde n se selecciona del grupo que consiste en 15 y 17, y con mayor preferencia es 17.

60. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 52-57, en donde A- es

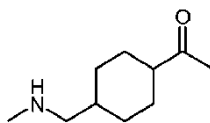


20 61. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-57 y 60, en donde p se selecciona del grupo que consiste en 12, 13 y 14, y con mayor preferencia es 13.

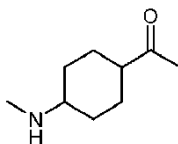
25 62. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-57 y 60-61, en donde d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, con mayor preferencia 0, 1 y 2 y con la máxima preferencia 1.

30 63. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-57 y 52-62, en donde d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2 y p se selecciona del grupo que consiste en 12, 13 o 14, con mayor preferencia d se selecciona del grupo que consiste en 1 y 2 y p se selecciona del grupo que consiste en 13 y 14, y con la máxima preferencia d es 1 y p es 13.

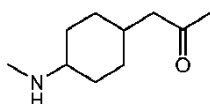
64. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-63, en donde -B- es



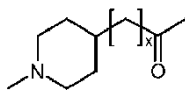
35 65. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-63, en donde -B- es



40 66. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-63, en donde -B- es

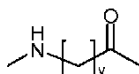


67. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-63, en donde -B- es



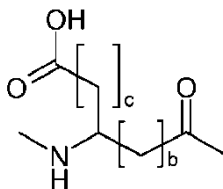
5 68. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 67, en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2, con mayor preferencia x se selecciona del grupo que consiste en 0 y 1 y con la máxima preferencia x es 0, o 1, preferentemente 0.

10 69. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-63, en donde -B- es



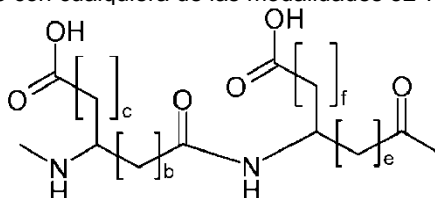
15 70. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 69, en donde y se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y con mayor preferencia y se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

71. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-70, en donde -C- es



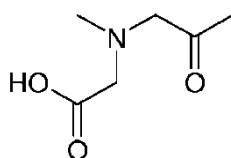
20 72. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 71, en donde c se selecciona del grupo que consiste en 0 y 1 y b se selecciona del grupo que consiste en 1 y 2, con mayor preferencia b es 1, o 2, preferentemente 2; y c es 0.

73. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-70, en donde -C- es

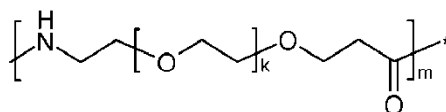


25 74. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 73, en donde f se selecciona del grupo que consiste en 0 y 1 y e se selecciona del grupo que consiste en 1 y 2, con mayor preferencia e es 1 y f es 0.

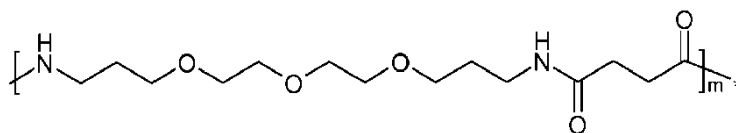
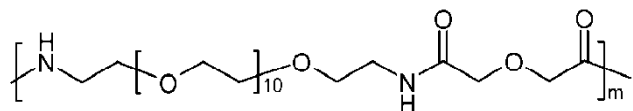
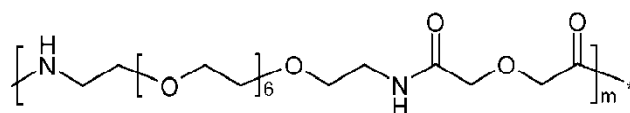
30 75. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-70, en donde -C- es



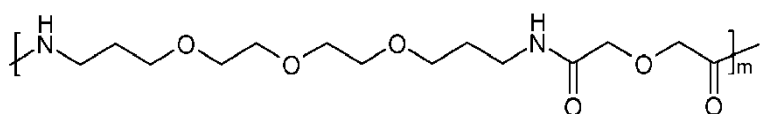
76. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-70, en donde D se selecciona del grupo que consiste en



35

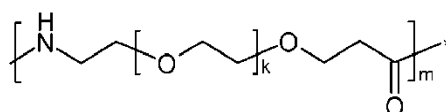


5 y



10 y en donde k se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

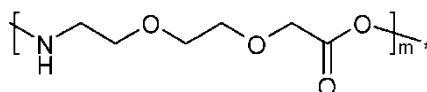
77. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es



15 78. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 77, en donde k se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 11 y 27, y con mayor preferencia k es 1.

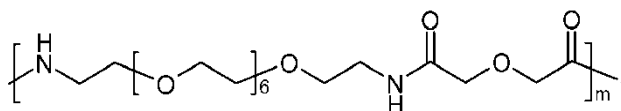
20 79. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 77-78, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

80. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es



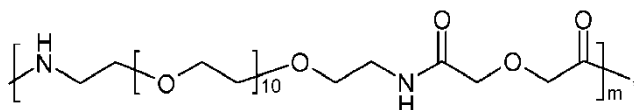
25 81. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 80, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

30 82. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es



35 83. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 82, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

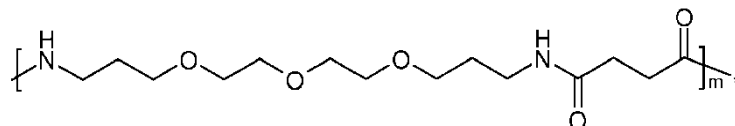
84. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es



85. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 84, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

5

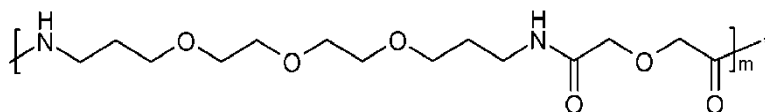
86. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es



87. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 86, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

10

88. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde -D- es

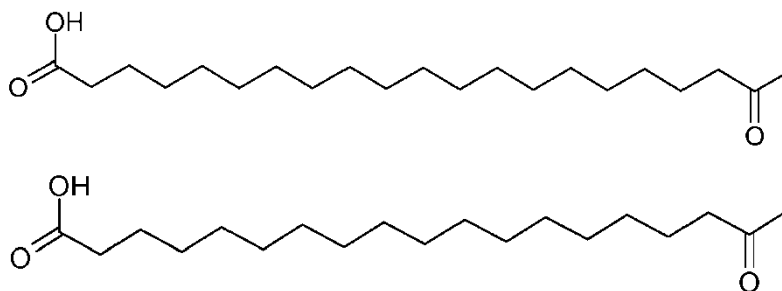


15

89. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 88, en donde m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, y con mayor preferencia m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

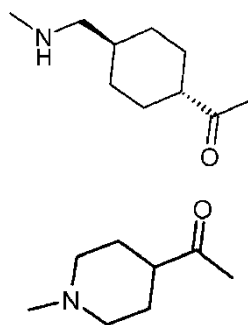
90. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde A-B-C-D- se selecciona y combina de

A-

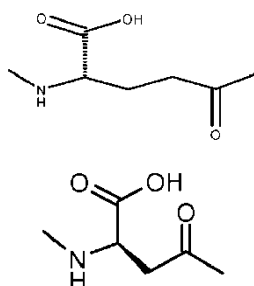


20

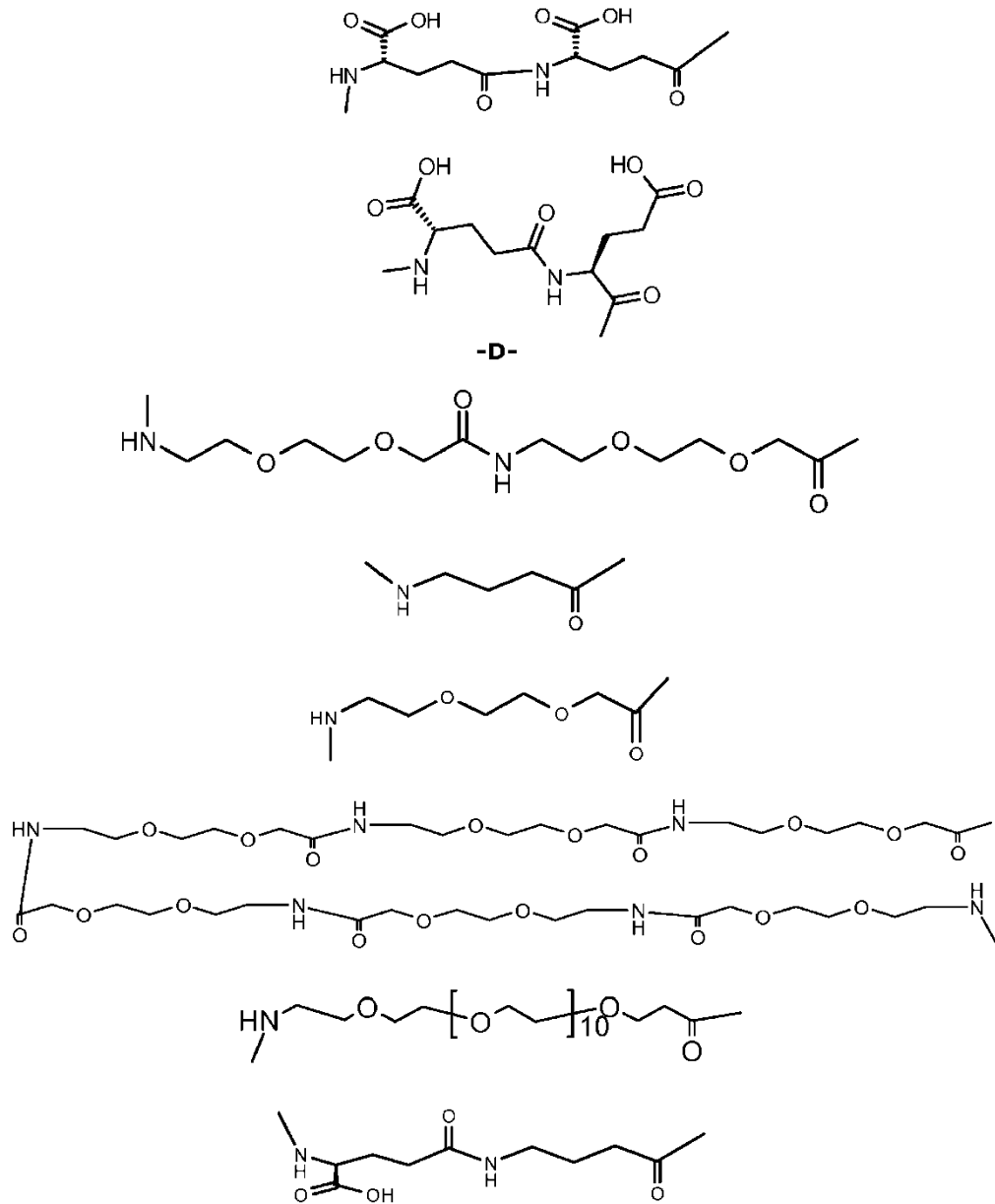
-B-



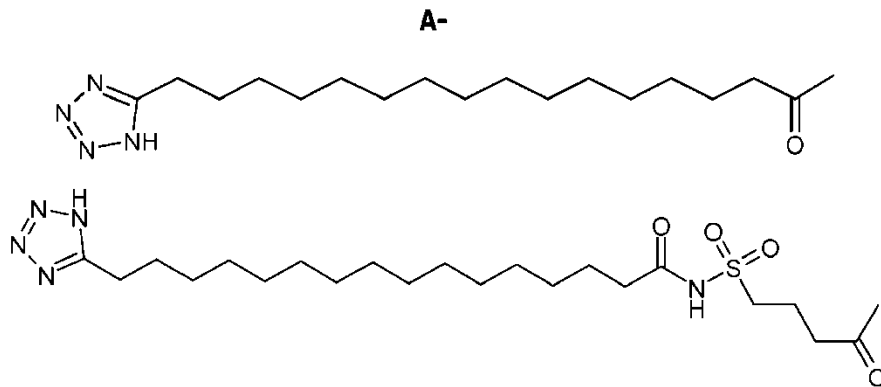
-C-



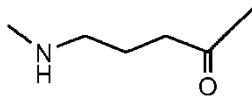
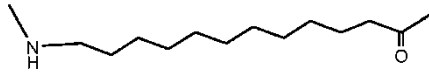
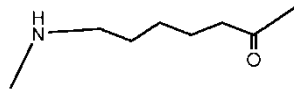
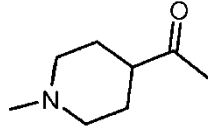
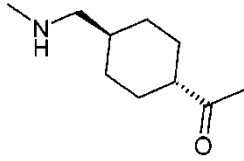
25



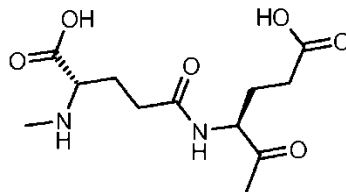
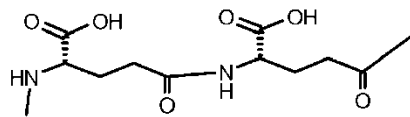
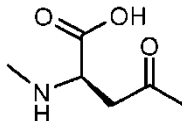
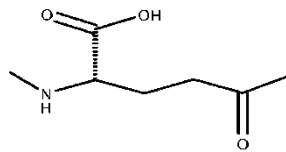
5 91. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde A-B-C-D- se selecciona y combina de



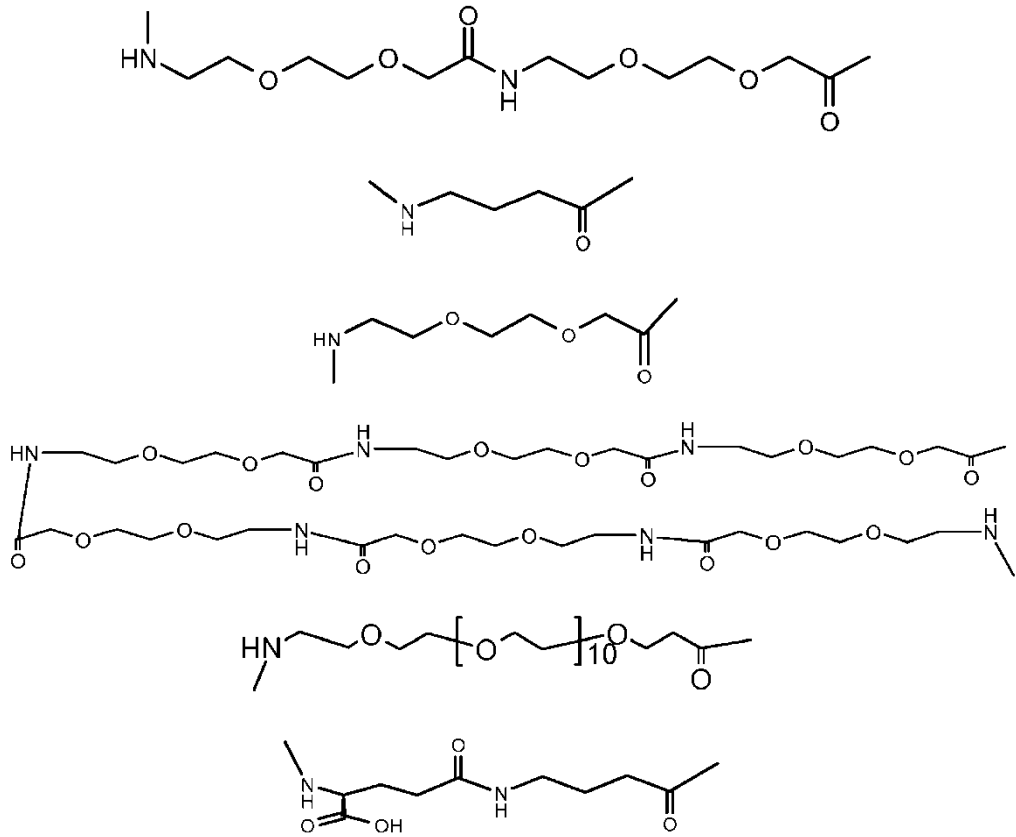
-B-



-C-

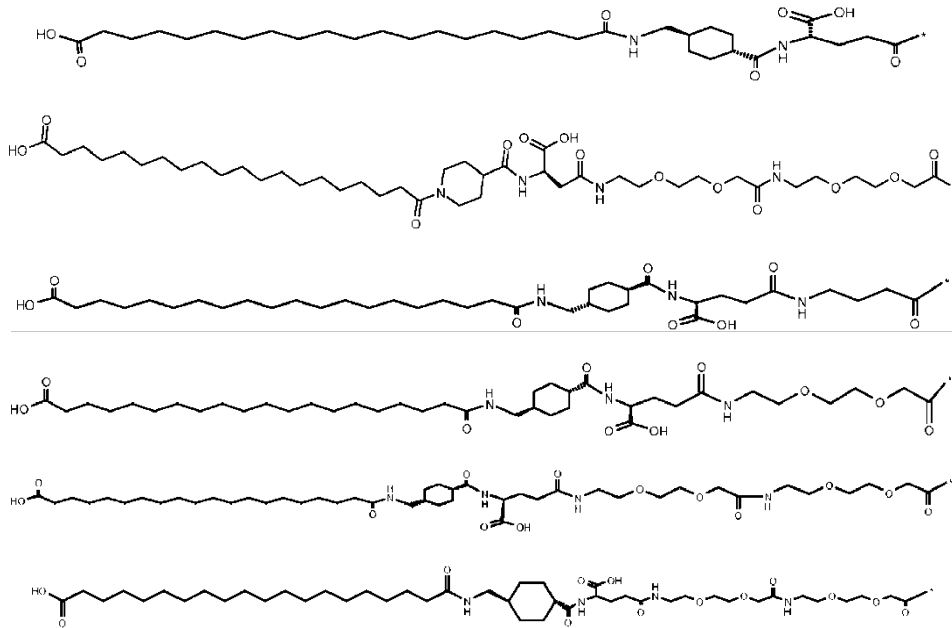


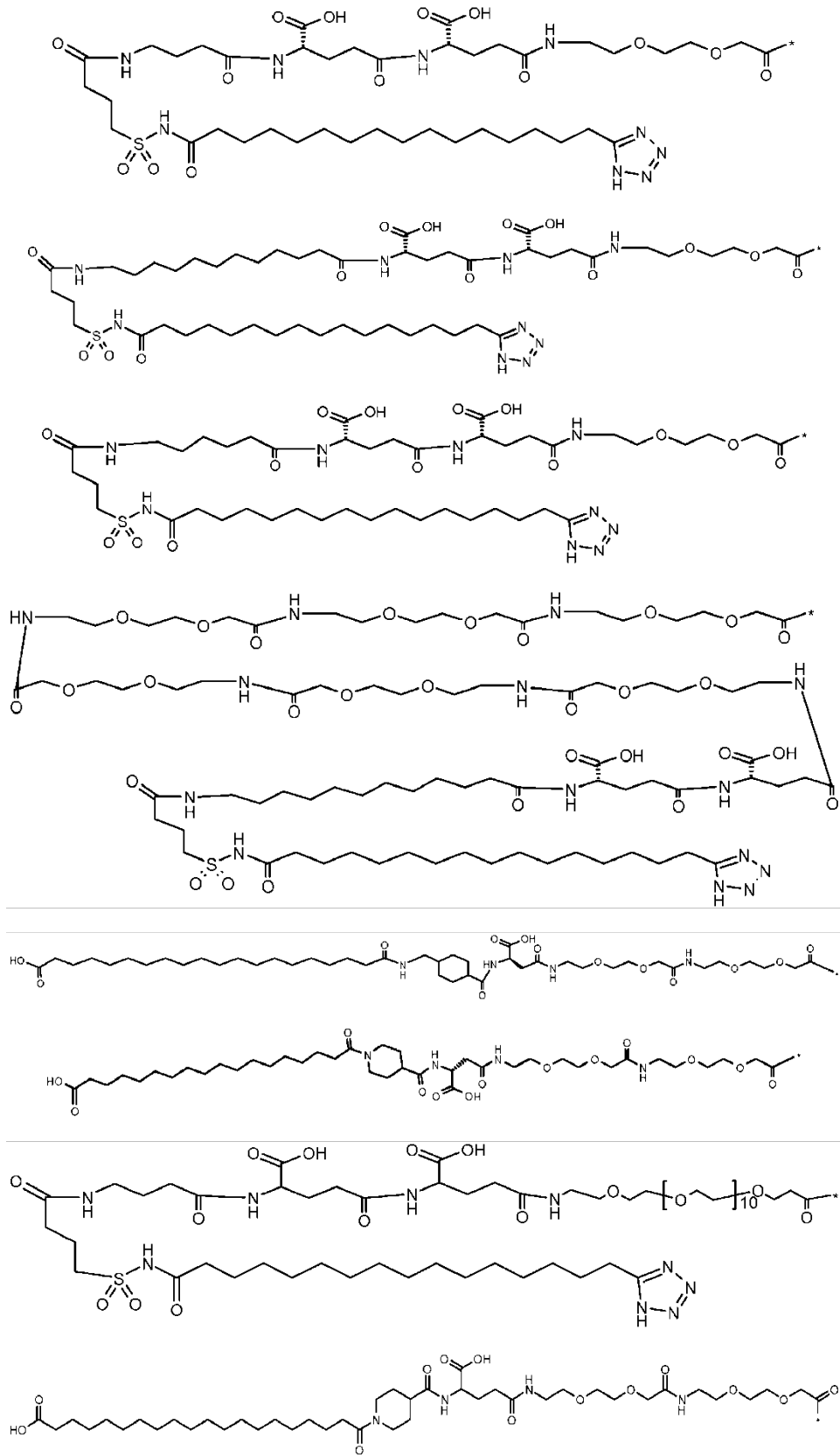
-D-



92. El derivado de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 52-76, en donde A-B-C-D- se selecciona del grupo que consiste en

5





N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil]
[DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37), y

5 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil] [Aib8,Glu22,Arg26,Lys31]GLP-1-(7-37).

94. Un método para aumentar el tiempo de acción de un análogo de GLP-1 en un paciente, caracterizado porque una secuencia de GLP-1 7-37 modificada (sec. con núm. de ident.: 1) se derivatiza o se pegila como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

10 95. Un método para aumentar el tiempo de acción de un derivado de GLP-1 en un paciente a más de aproximadamente 40 horas, caracterizado porque una secuencia de GLP-1 7-37 modificada (sec. con núm. de ident.: 1) se derivatiza o se pegila como se describe en cualquiera de las modalidades anteriores.

15 96. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

20 97. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 96, que es adecuada para la administración parenteral.

98. El uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93 para la preparación de un medicamento.

25 99. El uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

30 100. El uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93 para la preparación de un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

35 101. El uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93 para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de las células β y la masa de células β , y/o para restablecer a las células β la sensibilidad a la glucosa.

40 102. Un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-93 para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

Aspectos particulares adicionales

45 1. Un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1(7-37) modificada que tiene:

i) un total de 2-12 modificaciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1), que incluye

50 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-37), y
b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-37);

y

55 ii) que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37 o 39 de GLP-1(7-37).

60 2. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 modificaciones de aminoácidos; preferentemente 4-12, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 modificaciones de aminoácidos; o tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 12 modificaciones de aminoácidos; con mayor preferencia 5-11 modificaciones de aminoácidos; aún con mayor preferencia 6-10 modificaciones de aminoácidos; con la máxima preferencia 7-9 modificaciones de aminoácidos.

65 3. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-2 que comprende 2-8, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, sustituciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

4. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 3 que comprende 3-8, preferentemente 4-8, con mayor preferencia 5-8, aún con mayor preferencia 6-8, y con la máxima preferencia 7-8 sustituciones de aminoácidos.
5. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 3 que comprende i) 4, ii) 5, iii) 6, iv) 7, o v) 8 sustituciones de aminoácidos.
6. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3-5, que se sustituye en una o más de las posiciones 7, 8, 20, 25, 28, 30, 31, 34, 35, 36 o 37, preferentemente en la posición 7 y/u 8.
7. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-6, que comprende un aminoácido no natural en la posición 7 u 8.
8. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 7, que comprende 7-Desamino-histidina u 8-Aib.
9. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-7, que comprende uno o más de 7-Desamino-histidina, 8-Aib, 20K, 25V, 28F (m-CF₃), 30E, 30K, 31K, 34-Dap, 34R, 35-Aib, 35K, 35R, 36K, 37K, 37K-épsilon, 37P y/o 37R.
10. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-9, que comprende 1-3, preferentemente 1, 2 o 3, deleciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
11. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 10, en donde la deleción es C-terminal.
12. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 11, que es un derivado de GLP-1(7-36), de GLP-1(7-35) o de GLP-1(7-34).
13. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-9, que comprende 1-4, preferentemente 1, 2, 3 o 4, adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
14. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 13, en donde la adición es C-terminal.
15. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 14, que es un derivado de GLP-1(7-38), de GLP-1(7-39), de GLP-1(7-40), o de GLP-1(7-41).
16. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-15, que tiene (i) un grupo amida C-terminal; o (ii) un grupo ácido carboxílico C-terminal, preferentemente un grupo ácido carboxílico libre (-COOH), o sus sales.
17. Un derivado de GLP-1, preferentemente de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-16, que tiene la secuencia de fórmula (I)
- Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-R fórmula (I) (sec. con núm. de ident.: 2)

en donde

- (Xaa₇ - Xaa₈) es (L-histidina-Aib), (desamino-histidina-alanina), o (desamino-histidina-Aib);
- Xaa₉ es Glu, o un derivado de Glu tal como alfa,alfa-dimetil-Glu;
- Xaa₁₆ es Val, o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys, o Arg;
- Xaa₂₀ es Leu, o Lys;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys, o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala, o Asn;
- Xaa₂₅ es Ala, o Val;
- Xaa₂₇ es Glu, Ala, o Leu;
- Xaa₂₈ es Phe, o un derivado de Phe tal como m-CF₃-Phe;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;
- Xaa₃₁ es Trp, Cys, o Lys;
- Xaa₃₃ es Val, Cys, o Lys;
- Xaa₃₄ es Lys, Cys, Glu, Asn, Dap, o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente;
- Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;
- Xaa₃₇ es Gly, Aib, Cys, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;
- Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;

Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;

Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y

R es amida, o está ausente;

5 siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37, 38 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

10

18. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 17,

en donde

15 (Xaa₇-Xaa₈) es (L-histidina-Aib), o (desamino-histidina-alanina);

Xaa₉ es Glu;

Xaa₁₆ es Val;

Xaa₁₈ es Ser;

Xaa₂₀ es Leu o Lys;

20 Xaa₂₃ es Gln;

Xaa₂₄ es Ala;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₇ es Glu;

Xaa₂₈ es Phe o un derivado de Phe tal como m-CF₃-Phe;

25 Xaa₃₀ es Ala, Glu o Lys;

Xaa₃₁ es Trp o Lys;

Xaa₃₃ es Val;

Xaa₃₄ es Lys, Dap o Arg;

Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib o está ausente;

30 Xaa₃₆ es Arg, Lys o está ausente;

Xaa₃₇ es Gly, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg o está ausente;

Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg o está ausente;

Xaa₄₀ es Arg o está ausente;

35 Xaa₄₁ es Arg o está ausente; y

R es amida, o está ausente;

siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

40

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37, 38 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

19. Un derivado de GLP-1, preferentemente de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, que tiene la secuencia de fórmula (II)

45

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg- Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-
Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀- Xaa₄₁-R fórmula (II) (sec. con núm. de ident.: 3)

50 en donde

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

55 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, 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;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;

Xaa₃₁ es Lys, o Trp;

60 Xaa₃₃ es Val o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Dap, o Arg;

Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys-Aib o está ausente;

Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;

65 Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;

Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;
 Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y
 R es amida, o está ausente;

5 siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37, 38 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

10 20. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 19,

en donde

15 Xaa₇ es L-histidina o desamino-histidina;

Xaa₈es Ala o Aib;

Xaa₁₈es Ser;

Xaa₃₀es Ala, Glu o Lys;

20 Xaa₃₁es Lys o Trp;

Xaa₃₃es Val;

Xaa₃₄es Lys, Dap o Arg;

Xaa₃₅es Gly, Arg, Lys, Aib o está ausente;

Xaa₃₆es Arg, Lys o está ausente;

Xaa₃₇es Gly, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg o está ausente;

25 Xaa₃₈es Lys, Glu, Arg o está ausente;

Xaa₃₉es Lys, Arg o está ausente;

Xaa₄₀es Arg o está ausente;

Xaa₄₁es Arg o está ausente; y

30 R es amida o está ausente; siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉ o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega en una posición seleccionada de una posición equivalente a la posición 18, 20, 23, 30, 31, 34, 36, 37, 38 o 39 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

35 21. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-20, que se derivatiza en una posición.

22. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-20, que se derivatiza en una o más posiciones, preferentemente en dos posiciones, en tres posiciones, o en cuatro posiciones.

40 23. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-22, que se derivatiza en i) posición 18, ii) posición 20, iii) posición 23, iv) posición 30, v) posición 31, vi) posición 34, vii) posición 36, viii) posición 37, ix) posición 38 y/o x) posición 39.

45 24. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, que se derivatiza en i) posición 20, ii) posición 30, iii) posición 31, iv) posición 36, v) posición 37, vi) posición 38 o vii) posición 39.

25. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-24, que se pega.

50 26. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-24, en donde el residuo de unión a la albúmina se selecciona de i) alquilo de cadena lineal, preferentemente alquilo de C15; ii) acilo de la fórmula CH₃(CH₂)_rCO-, en donde r es preferentemente 14 o 16.

55 27. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-24 y 26, que incluye un conector entre el residuo de unión a la albúmina y la porción de GLP-1, en donde el conector comprende, preferentemente es,

i) una o más unidades de alquilenglicol tales como 1-10, preferentemente 5-8, con mayor preferencia 6;

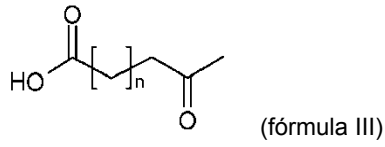
ii) un compuesto C de fórmula X en donde c es 0 y b es 2;

iii) un compuesto de fórmula XVI en donde q es 1 o 2; o

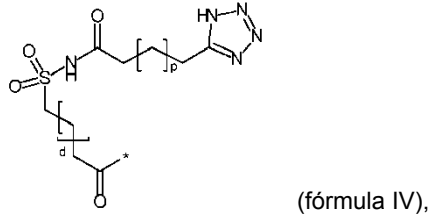
60 iv) cualquier combinación de i)-iii), tal como una combinación de ii) y iii).

28. Un derivado de GLP-1, preferentemente de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-27, en donde al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-

65 en donde A- se selecciona del grupo que consiste en



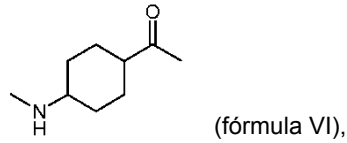
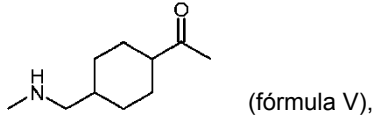
y



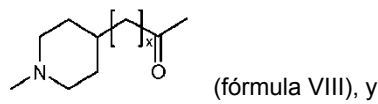
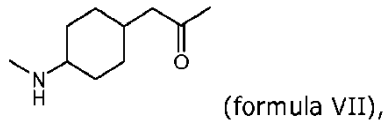
5 en donde el anillo tetrazol está N-sustituido opcionalmente, y

en donde n se selecciona del grupo que consiste en 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se selecciona del grupo que consiste en 10, 11, 12, 13 y 14, y d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

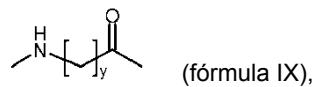
10 -B- se selecciona del grupo que consiste en



15

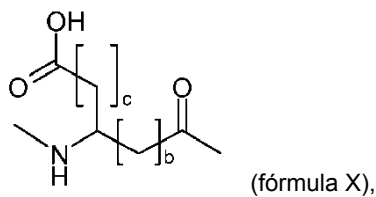


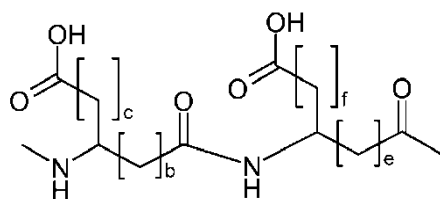
20



en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, e y se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

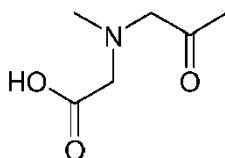
25 -C- se selecciona del grupo que consiste en





(fórmula XI),

y



(fórmula XII),

- 5 en donde b y e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2, y c y f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2 siempre y cuando b es 1 o 2 cuando c es 0, o b es 0 cuando c es 1 o 2, y e es 1 o 2 cuando f es 0, o e es 0 cuando f es 1 o 2, y

-D- se une a dicho residuo de aminoácido y es un conector.

- 10 29. El derivado de GLP-1 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-28, en donde el residuo de aminoácido derivatizado es lisina, que se derivatiza preferentemente a través del grupo épsilon amino.

- 15 30. Un derivado de GLP, preferentemente de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-29, que se selecciona de los siguientes:

- N-épsilon37{2-[2-(2-[2-(2-((R)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [desaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
- 20 N-épsilon37{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
- N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-((R)-3-[1-(17-carboxiheptadecanoil)piperidin-4-ilcarbonilamino]3-carboxipropionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Phe(m-CF3)28]GLP-1-(7-37)amida;
- 25 N-épsilon30{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Lys30]GLP-1-(7-37);
- N-épsilon31{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-37);
- 30 N-épsilon31-(2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxi-nonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil) [Aib8, Glu22, Arg26, Lys31, Arg34]GLP-1-(7-37);
- N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
- 35 N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
- N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37);
- 40 N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37);
- 45 N-épsilon20-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino)dodecanoilamino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30, Pro37]GLP-1-(7-37)amida;
- N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino)dodecanoilamino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
- 50 N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino)dodecanoilamino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetil [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;

- [Aib8, Glu22, Arg26, Glu30, Pro37]GLP-1-(7-37)Lys[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(4-carboxi-4-{4-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butirilamino]butirilamino}butirilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil];
 N-épsilon37(Polietilenglicol2000) [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1(7-37)amida;
 N-épsilon37(3-((2-(2-(2-(2-hexadeciloietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)propionil)
 5 [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1(7-37)-amida;
 N-épsilon37-{2-(2-(2-(2-(2-(4-(hexadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etoxi}etoxi)acetil)etoxi)etoxi)acetil}}-
 [desaminoHis7, Glu22, Arg26, Glu30, Arg34, Lys37](GLP-1-(7-37)amida
 N-épsilon37-{2-(2-(2-(2-(2-(4-(hexadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etoxi}etoxi)acetil)etoxi)etoxi)acetil}}-
 [desaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida;
 10 N-épsilon37-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(octadecanoilamino)etoxi}etoxi)acetilamino)etoxi}etoxi)acetilamino)etoxi}etoxi)acetil)[desaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg
 34, Lys37]GLP-1(7-37)amida
 N-épsilon36-(2-(2-(2-((2-[2-(2-(17-carboxiheptadecanoilamino)etoxi}etoxi)acetilamino)etoxi}etoxi)acetil)
 [Aib8, Glu22, Arg26, Glu30, Lys36]GLP-1(7-37)Glu-amida;
 15 N-épsilon37-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril] [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-
 (7-37)amida;
 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(19-
 carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil]
 [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37);
 20 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8, Glu22, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-37);
 N-épsilon20-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butirilamino)etoxi}etoxi)acetilamino)etoxi}etoxi)-
 acetil] [Aib8, Lys20, Glu22, Arg26, Glu30, Pro37]GLP-1-(7-37)amida;
 N-épsilon37-(2-{2-[2-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-
 25 nonadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}butirilamino)etoxi}etoxi)acetil)[DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]
 GLP-1-(7-37);
 N-épsilon37-{2-[2-(2-((S)-4-((S)-4-(12-{4-[16-(2-terc-butyl-2H-tetrazol-5-il)-
 hexadecanoilsulfamoil]butirilamino}dodecanoilamino)-4-carboxibutirilamino]-4-
 carboxibutirilamino)etoxi}etoxi]acetil}[DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1(7-37);
 30 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-
 acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil] [Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37).
 N-alfa37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-
 etoxi}-etoxi)-acetil][Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, épsilon-Lys37]GLP-1-(7-37)péptido;
 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-
 35 acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil] [desaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37);
 N-épsilon36-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-
 acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil][desaminoHis7, Glu22, Arg26, Glu30, Arg34, Lys36]GLP-1-(7-37)-Glu-Lys péptido;
 [desaminoHis7, Glu22, Arg26, Glu30, Arg34]GLP-1-(7-37)-Glu-Lys(2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil) péptido;
 40 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino]butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib
 8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37);
 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-
 acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil] -[Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Aib35, Lys37]GLP-1- (7-37);
 45 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Arg
 34, Arg35, Arg37]GLP-1-(7-37);
 N-épsilon31{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-
 50 [Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Arg34, Arg35, Arg37]}GLP-1(7-37)il [Arg39, Arg40, Arg41];
 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-((S)-4-carboxi-4-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Lys
 35, Lys36]GLP-1-(7-36)amida;
 N-épsilon31-{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-N-beta34-(2-(bis-
 55 carboximetilamino)acetil)[Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31, Dap34]GLP-1(7-34)amida; y
 N-épsilon37-((S)-4-carboxi-4-(2-{2-[2-(2-{2-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetilamino)butiril][Aib8, Glu22, Arg26, 34, Lys37]GLP-
 1(7-37).

31. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-30 o su sal, amida, alquilo o éster o similar aceptable farmacéuticamente, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

32. Un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-30, o una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 31, para su uso como un medicamento.

33. Un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-30, o una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 31, para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

34. El derivado o composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 33, para su uso en el tratamiento o prevención de la diabetes tipo 2.

35. El uso de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-30, o una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 31, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

36. El uso de acuerdo con la modalidad 35 para el tratamiento o prevención de la diabetes tipo 2.

37. Un método para tratar o prevenir la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas mediante la administración de una cantidad activa farmacéuticamente de un derivado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-30, o una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 31.

38. El método de acuerdo con la modalidad 37 para tratar o prevenir la diabetes tipo 2.

Todos los títulos y subtítulos en la presente descripción se usan solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera. Cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus variantes posibles se abarca por la invención a menos que se indique de otra forma en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera.

Los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra forma en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente.

La relación de intervalos de valores en la presente descripción solo pretende servir como un método de escritura rápido para referirse individualmente a cada valor separado comprendido dentro del intervalo, a menos que se indique de otra forma en la presente descripción, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si se indicara individualmente en la presente descripción. A menos que se establezca de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en la presente descripción son representativos de los valores aproximados correspondientes (*por ejemplo*, puede considerarse que todos los valores exactos ilustrativos proporcionados con respecto a un factor o medición particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente"; donde sea apropiado).

Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra forma en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o de un lenguaje ilustrativo (*por ejemplo*, "tal como") proporcionados en la presente descripción, pretende meramente iluminar mejor la invención y no presenta una limitación en el alcance de la invención a menos que se indique de otra forma. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica que cualquier elemento es esencial para la práctica de la invención a menos que se establezca explícitamente.

La citación e incorporación de documentos de patente en la presente descripción se hace sólo por conveniencia y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de dichos documentos de patente.

La descripción en la presente de cualquier aspecto o modalidad de la invención mediante el uso de términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto o modalidad similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se establezca de cualquier otra manera o el contexto lo contradiga claramente (*por ejemplo*, una formulación descrita en la presente que comprende un elemento particular debe entenderse como que describe, además, una formulación que consiste de ese elemento, a menos que se indique de cualquier otra manera o el contexto lo contradiga claramente).

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes métodos y ejemplos representativos que, sin embargo, no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

5 Las características descritas en la descripción anterior y en los ejemplos siguientes pueden ser, tanto por separado como en cualquiera de sus combinaciones, material para realizar la invención en sus diversas formas.

EJEMPLOS

Abreviaturas usadas:

- 10 t.a: Temperatura ambiente
 DIPEA: diisopropiletilamina
 H₂O: agua
 CH₃CN: acetonitrilo
 DMF: N,N-dimetilformamida
 15 HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
 Fmoc: 9 H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
 Boc: terc-butiloxicarbonilo
 OtBu: éster terc-butílico
 tBu: terc-butilo
 20 Trt: trifenilmetilo
 Pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
 Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
 ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
 Mtt: 4-metiltrilito
 25 Mmt: 4-metoxitritilo
 DCM: diclorometano
 TIS: triisopropilsilano
 TFA: ácido trifluoroacético
 Et₂O: dietiléter
 30 NMP: 1-metil-pirrolidin-2-ona
 DIPEA: Diisopropiletilamina
 HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol
 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 DIC: Diisopropilcarbodiimida
 35 PM: Peso molecular

A: Síntesis de péptido unido a resina

SPPS Método A.

- 40 La peptidilresina protegida se sintetizó de acuerdo con la estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos 433 Applied Biosystems en escala de 0,25 mmol o 1,0 mmol mediante el uso de los protocolos FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean acoplamiento mediados por HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) en NMP (N-metilpirrolidona), y monitoreo UV de la desprotección del grupo de protección Fmoc. La resina de partida
 45 usada para la síntesis de péptidos amidas fue resina Rink-Amida y se usó resina Wang o clorotritilo para los péptidos con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos- Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem) suministrados en cartuchos pesados previamente adecuados para el sintetizador ABI433A con la excepción de 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 usó Boc-His (Boc) OH para los péptidos con His en el N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en la posición 26 se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta para la unión de la porción de unión a la albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede mejorarse en algunos casos mediante el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido amídico con un grupo que puede
 55 escindirse en condiciones ácidas, tales como, pero sin limitarse a, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, pueden usarse dipéptidos de pseudoprolina (ver, por ejemplo, el catálogo de Novabiochem 2002/2003 o una versión más reciente, o WR Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403.

60 SPPS Método B:

- Un método alternativo (método B) de síntesis de péptidos fue mediante química de Fmoc en un sintetizador de péptidos Liberty basado en microondas (CEM Corp., Carolina del Norte). La resina fue Tentagel S RAM con una carga de 0,24 mmol/g. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP mediante el uso de soluciones de aminoácidos de 0,3 M en NMP y un exceso molar de 8-10 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron de 5 minutos hasta 70 °C. La desprotección se hizo con piperidina al 5 % en NMP hasta 70 °C. Cuando se deseó una

modificación química de una cadena lateral de la lisina, la lisina se incorporó como Lys (Mtt). El grupo Mtt se eliminó mediante la suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol puro durante 20 minutos seguido de lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó por síntesis manual o por uno o más pasos automatizados en Liberty, seguido por un acoplamiento manual. Otro método de síntesis de péptidos fue mediante química de Fmoc en un ABI 433 con acoplamiento por HBTU. Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM y se secó, y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2 horas con TFA/TIS/agua (92,5/5/2,5) seguido de precipitación con éter dietílico. El péptido se redisolvió en ácido acético al 30 % o solvente similar y se purificó mediante RP-HPLC estándar en una columna C18 mediante el uso de acetonitrilo/TFA. La identidad del péptido se confirmó por MALDI-MS.

10 SPPS Método C

La peptidilresina protegida se sintetizó de acuerdo con la estrategia de Fmoc en una escala de 0,25 mmol de Advanced ChemTech Synthesizer (APEX 348) mediante el uso de los protocolos suministrados por el fabricante que emplean acoplamientos mediados por DIC (diciclohexilcarbodiimida) y HOBt (1-hidroxibenzotriazole) en NMP (N-metilpirrolidona). La resina de partida usada para la síntesis de péptidos amidas fue resina Rink-Amida y se usó resina Wang o clorotritilo para los péptidos con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem). El aminoácido N terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ejemplo, se usó Boc-His (Boc) OH para los péptidos con His en el N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en la posición 26 se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta para la unión de la porción de unión a la albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede mejorarse en algunos casos mediante el uso de dipéptidos, por ejemplo, pseudoprolinas de Novabiochem, Fmoc-Ser(tbu)-ΨSer(Me,Me)-OH, ver, por ejemplo, el catálogo de Novabiochem 2002/2003 o una versión más reciente, o W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403.

25 Procedimiento para la eliminación de la protección con ivDde o Dde.

La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato de agitación/filtración manual y se trató con hidrazina al 2 % en N-metilpirrolidona (20 ml, 2 x 12 min) para eliminar el grupo Dde o ivDde y se lavó con N-metilpirrolidona (4 x 20 ml).

30 Procedimiento para la eliminación de la protección con Mtt o Mmt.

La resina (0,25 mmol) se colocó en un aparato de agitación/filtración manual y se trató con TFA al 2 % de TIS al 2-3 % en DCM (20 ml, 5-10 min se repitió 6-12 veces) para eliminar el grupo Mtt o Mmt y se lavó con DCM (2 x 20 ml), MeOH al 10 % y DIPEA al 5 % en DCM (2 x 20 ml) y N-metilpirrolidona (4 x 20 ml).

35 Procedimiento alternativo para la eliminación de la protección con Mtt:

La resina se colocó en una jeringa y se trató con hexafluoroisopropanol durante 2 x 10 min para eliminar el grupo Mtt. Después la resina se lavó con DCM y NMP como se describió anteriormente.

Procedimiento para la unión de cadenas laterales al residuo de lisina.

45 El residuo de unión a la albúmina (B-U-cadena lateral de fórmula I) puede unirse al péptido por acilación al péptido unido a la resina o acilación en solución al péptido desprotegido mediante el uso de reactivo de acilación estándar tal como, pero sin limitación, DIC, HOBt/DIC, HOAt/DIC o HBTU.

Unión al péptido unido a resina:

50 Ruta I

El residuo de unión a la albúmina (A-B)-cadena lateral de fórmula I) activado (éster activo o anhídrido simétrico) tal como el éster mono-(2,5-pirrolidin-1-il) del ácido octadecadienoico (Ebashi y otros. EP511600, 4 equivalentes molares con relación al péptido unido a la resina) se disolvió en NMP (25 ml), se añadió a la resina y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó exhaustivamente con NMP, diclorometano, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

Ruta II

60 El residuo de unión a la albúmina (A-(B)-cadena lateral de fórmula I) se disolvió en N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1, 10 ml). Se añadió el reactivo de activación tal como hidroxibenzotriazol (HOBt) (4 equivalentes molares con relación a la resina) y diisopropilcarbodiimida (4 equivalentes molares con respecto a la resina) y la solución se agitó durante 15 minutos. La solución se añadió a la resina y se añadió diisopropiletilamina (4 equivalentes molares con relación a a la resina). La resina se agitó de 2 a 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con N-metilpirrolidona (2 x 20 ml), N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y cloruro de metileno (2 x 20 ml).

Ruta III

5 El residuo de unión a la albúmina (A-B-cadena lateral de fórmula I) activado (éster activo o anhídrido simétrico) como el éster mono-(2,5-pirrolidin-1-il) del ácido octadecadienoico (Ebashi y otros, EP511600, 1-1,5 equivalentes molares con relación al péptido se disolvió en un disolvente orgánico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mezcla de agua/solvente orgánico (1-2 ml) y se añadieron a una solución del péptido en agua (10-20 ml) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de grupos protectores en el residuo de unión a la albúmina tal como terc-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó durante toda la noche y después se desprotegió el péptido crudo aislado
10 - en el caso de un grupo terc-butilo el péptido se disolvió en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 minutos la mezcla se evaporó al vacío y el péptido final se purificó por HPLC preparativa.

15 Procedimiento para la eliminación de la protección con Fmoc: La resina (0,25 mmol) se colocó en un matraz de filtración en un aparato de agitación manual y se trató con N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y con N-metilpirrolidona (1 x 20 ml), una solución de piperidina al 20 % en N-metilpirrolidona (3 x 20 ml, 10 minutos cada uno). La resina se lavó con N-metilpirrolidona (2 x 20 ml), N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y cloruro de metileno (2 x 20 ml).

20 Procedimiento para escindir el péptido de la resina:

25 El péptido se escindió de la resina mediante agitación durante 180 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (95: 2,5:2,5 a 92:4:4). La mezcla de escisión se filtró y el filtrado se concentró hasta un aceite mediante una corriente de nitrógeno. El péptido crudo se precipitó de este aceite con 45 ml de éter dietílico y se lavó de 1 a 3 veces con 45 ml de éter dietílico.

Purificación: El péptido crudo se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 20 mm x 250 mm empacada con sílice C-18 de 5 μ o 7 μ . En dependencia del péptido, se usaron uno o dos sistemas de purificación.

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

35 Sulfato de amonio: La columna se equilibró con 40 % de CH₃CN en ((NH₄)₂SO₄ 0,05 M, que se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ concentrado. Después de secarlo, el péptido crudo se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50 % en H₂O y se diluyó a 20 ml con H₂O y se inyectó en la columna que después se eluyó con un gradiente de 40 % -60 % de CH₃CN en (NH₄)₂SO₄ 0,05M, pH 2,5 a 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Las fracciones que contenían el péptido se recogieron y se diluyeron con 3 volúmenes de H₂O y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak® C18 (Waters
40 núm. de pieza: 51910) que se equilibró con TFA al 0,1 %. Después se eluyó con un 70 % de CH₃CN que contenía TFA al 0,1 % y el péptido purificado se aisló por liofilización después de la dilución del eluato con agua.

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

45 El análisis de RP-HPLC puede realizarse mediante el uso de detección de UV a 214 nm y por ejemplo, una columna de sílice Vydac 218TP54 C-18 de 4,6 mm x 250 mm de 5 μ (The Separations Group, Hesperia, Estados Unidos) y se eluyó, por ejemplo, a 1 ml/min a 42 °C. Muy a menudo se usaron una de las condiciones específicas siguientes:

Método 03_A1_1

50 HPLC (Método 03_A1_1): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Las detecciones UV se recogieron a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna de sílice 218TP54 C-18 de 4,6 mm x 250 mm de 5 μ (The Separations Group, Hesperia), que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con 10 % de sulfato de amonio 0,5 M, que se ajustó a pH 2,5 con ácido sulfúrico 4M. Después de la inyección, la muestra se eluyó mediante un gradiente de 0 % a 60 % de acetonitrilo en el mismo tampón acuoso durante 50 minutos.

Método 03_B1_2

60 HPLC (Método 03_B1_2): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Las detecciones UV se recogieron a 214, 254, 276 y 301 nm en columna de sílice Zorbax 300SB C-18 (4,5 x 150 mm, 5 μ) que se eluyó a 0,5 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %). Después de la inyección, la muestra se eluyó mediante un gradiente de 0 % a 60 % de acetonitrilo (+ TFA al 0,1 %) en una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %) durante 50 min.

65 Método 02_B1_1

5 HPLC (Método 02_B1_1): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Las detecciones UV se recogieron a 214 nm y 254 nm mediante el uso de una columna Vydac 218TP53, C18, 300 Å, 5 µm, 3,2 mm x 250 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 0-60 % de acetonitrilo, 95-35 % de agua y 5 % de ácido trifluoroacético (1,0 %) en agua durante 50 minutos, a una velocidad de flujo de 0,50 ml/min.

Método 01_B4_2

10 HPLC (Método 01_B4_2): Se realizaron análisis de RP mediante el uso de un sistema Waters 600S equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se recogieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm mediante el uso de una columna Symmetry300 C18, 5 µm, 3,9 mm x 150 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 5-95 % de acetonitrilo, 90-0 % de agua y 5 % de ácido trifluoroacético (1,0 %) en agua durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min.

15 Método 02_B4_4

20 HPLC (Método 02_B4_4): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Se recogieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm mediante el uso de una columna Symmetry300 C18, 5 µm, 3,9 mm x 150 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 5-95 % de acetonitrilo, 90-0 % de agua y 5 % de ácido trifluoroacético (1,0 %) en agua durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min.

Método 02_B6_1

25 HPLC (Método 02_B6_1): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Se recogieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm mediante el uso de una columna Vydac 218TP53, C18, 300 Å, 5 µm, 3,2 mm x 250 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 0-90 % de acetonitrilo, 95-5 % de agua, y 5 % de ácido trifluoroacético (1,0 %) en agua durante 50 minutos a una velocidad de flujo de 0,50 ml/min.

30 Método 03_B6_1

35 HPLC (Método 03_B1_1): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se recogieron detecciones UV a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna de sílice 218TP54 C-18 de 4,6 mm x 250 mm de 5 µm (The Separations Group, Hesperia), que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con 5% de acetonitrilo (+ TFA al 0,1 %) en una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %). Después de la inyección, la muestra se eluyó mediante un gradiente de 0 % a 90 % de acetonitrilo (+ TFA al 0,1 %) en una solución acuosa de TFA en agua (0,1 %) durante 50 min.

40 Alternativamente, puede realizarse una elución por gradiente preparativo como se indicó anteriormente y se indica el porcentaje de acetonitrilo al cual eluye el compuesto. La identidad se confirma mediante MALDI.

Se usó el equipamiento siguiente:

45 La LCMS se realizó en un sistema que constaba de un espectrómetro de masas Sciex API 100 de cuadrupolo simple, bomba Perkin Elmer Serie 200 Quard, muestreador automático Perkin Elmer Serie 200, detector UV Applied Biosystems 785A, detector evaporativo de dispersión de la luz Sedex 75.

50 El control del instrumento y la adquisición de datos se hicieron mediante el programa informático de control Sciex Sample que se ejecuta en una computadora con Windows 2000.

La bomba de HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

55 A: Ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua
B: Ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo

El análisis se realiza a temperatura ambiente mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 20 µl) en la columna que se eluye con un gradiente de acetonitrilo.

60 Las condiciones del HPLC, los parámetros del detector y los parámetros del espectrómetro de masas usado se muestran en la tabla siguiente.

65

Columna	:Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente	:5 % - 90 % de acetonitrilo lineal durante 7,5 min a 1,5 ml/min
Detección	:210 nm (salida análoga del DAD)

ELS (salida análoga del ELS), 40 °C
MS modo de ionización API-ES

5 Alternativamente, se realizó LCMS en un sistema que consiste en bomba binaria Hewlett Packard serie 1100 G1312A, compartimiento para columna Hewlett Packard serie 1100, detector de matriz de diodo Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD, Hewlett Packard serie 1100 MSD y detector evaporativo de dispersión de la luz Sedere 75 controlado por el programa informático HP Chemstation. La bomba de HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

10

A: NH₄OH 10mM en agua
B: NH₄OH 10 mM en 90 % de acetonitrilo

15 El análisis se realizó a 23 °C mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 20 µl) en la columna que se eluye con un gradiente de A y B. Las condiciones de HPLC, parámetros del detector y parámetros del espectrómetro de masas usados se muestran en la tabla siguiente.

20

Columna	Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente	5 % - 100 % de acetonitrilo lineal durante 6,5 min a 1,5 ml/min
Detección	210 nm (salida análoga del DAD)

25 ELS (salida análoga del ELS)
MS modo de ionización API-ES. Escaneo 100-1000 amu paso 0,1 amu

MALDI-MS:

30 Los pesos moleculares de los péptidos se determinaron mediante el uso de espectroscopía de masas de tiempo de vuelo desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS), y se registraron en un Microflex (Bruker). Se usó una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxi cinámico.

Condiciones de HPLC analítica (método I):

35 Equilibración de la columna (Xterra TM MS C18, 5 um, columna 4,6 × 150 mm, P7N 186 000490) con TFA al 0,1 %/H₂O y elución mediante un gradiente de CH₃CN 0 %/TFA al 0,1 %/H₂O a CH₃CN al 60 %/TFA al 0,1 %/H₂O durante 25 minutos seguido de un gradiente de 60 % a 100 % durante 5 min.

40 En los ejemplos de esta invención, la nomenclatura y los gráficos estructurales significan:

Se usan símbolos de una letra para los aminoácidos naturales, por ejemplo, H es L-histidina, A es L-alanina, etcétera. Pueden usarse, además, abreviaturas de tres letras para los aminoácidos, por ejemplo, His es L-histidina, Ala es L-alanina, etcétera. Para los aminoácidos no naturales, se usan abreviaturas de tres letras, como Aib para ácido aminoisobutírico. La posición de los aminoácidos puede indicarse con un número en superíndice después de los símbolos de aminoácidos tales como Lys³⁷ o como Lys37. El grupo amino N-terminal puede simbolizarse como NH₂ o como H. El grupo carboxílico C-terminal puede simbolizarse como -OH o como -COOH. El grupo amida C-terminal se simboliza como -NH₂

Las subestructuras

50



55 significan ambas His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe.

El grupo amino épsilon de la Lisina puede describirse como el símbolo griego ε o como se deletrea "épsilon".

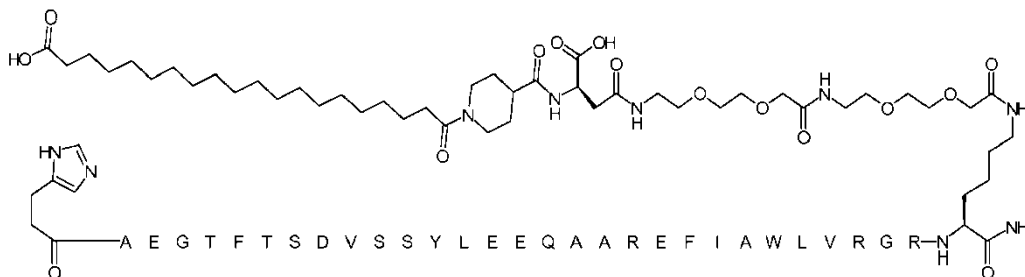
60 Las estructuras en los ejemplos a continuación son en varios casos una combinación de símbolos de una letra para los aminoácidos naturales, combinados con la abreviatura de tres letras Aib para el ácido aminoisobutírico. En varios casos, algunos de los aminoácidos se muestran en la estructura completa expandida. Por lo tanto, la lisina que se ha derivatizado puede mostrarse como las estructuras completas expandidas en el ejemplo 1 donde la lisina en la posición 37 está expandida. El nitrógeno (con H indicado) entre la arginina en la posición 36 y la lisina expandida en

la posición 37 es por lo tanto el nitrógeno del enlace peptídico que conecta los dos aminoácidos en el ejemplo 1. De acuerdo con el procedimiento anterior, se prepararon los siguientes derivados como ejemplos no limitantes de la invención:

5 Ejemplo de referencia 1

N-épsilon37{2-[2-(2-[2-(2-((R)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino)propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1(7-37)amida

10



Método de preparación: A

15 HPLC método B6:

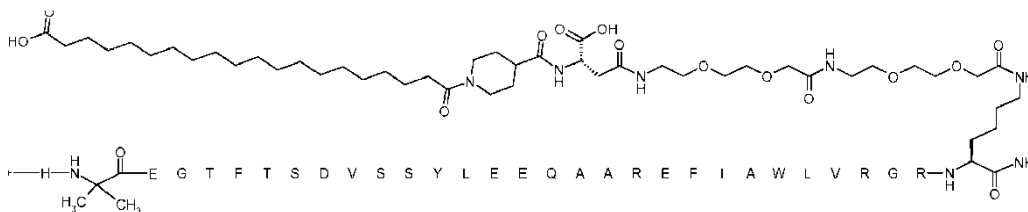
RT= 35,49 min
LCMS: m/z = 1096,2 (M+3H)³⁺
PM calculado = 4380,0

20

Ejemplo de referencia 2

N-épsilon37{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino)propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)amida

25



Método de preparación: B

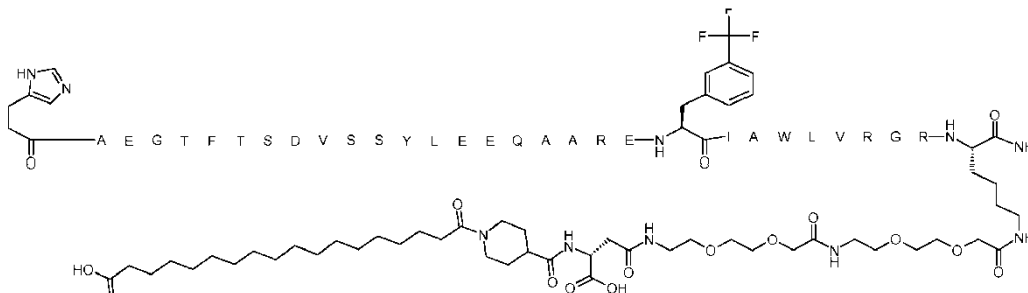
30

El péptido se eluyó a 66 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4409,1

35 Ejemplo de referencia 3

N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-((R)-3-[1-(17-carboxiheptadecanoil)piperidin-4-ilcarbonilamino]3-carboxipropionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][DesaminoHis 7,Glu22,Arg26,Arg34,Phe(m-CF3)28]GLP-1-(7-37)amida

40



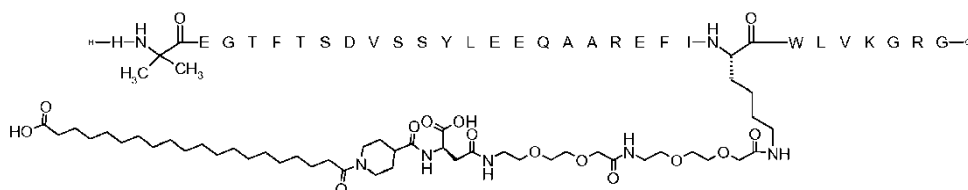
Método de preparación: A

HPLC (método B):

5 RT= 11,92 min
LCMS: m/z = 1474,8 (M+3H)³⁺
PM calculado = 4420,0

Ejemplo de referencia 4

10 N-épsilon30{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil[Aib8, Glu22, Arg26, Lys30]GLP-1-(7-37)}



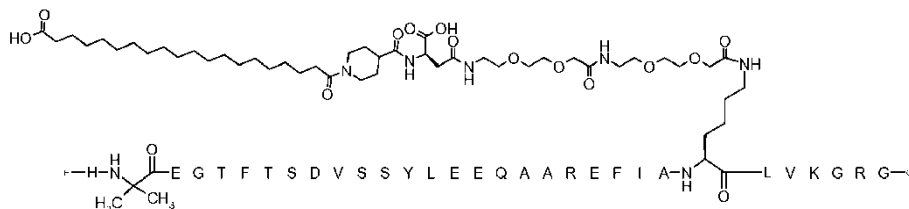
15 Método de preparación: Método A excepto que el péptido se preparó en un Apex396 de Advanced Chemtech mediante el uso de un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo Mtt se desprotegió con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

20 HPLC método I:

RT= 27,6 min
MALDI-MS: 4367,9

25 Ejemplo 5

N-épsilon31{2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil[Aib8, Glu22, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-37)}



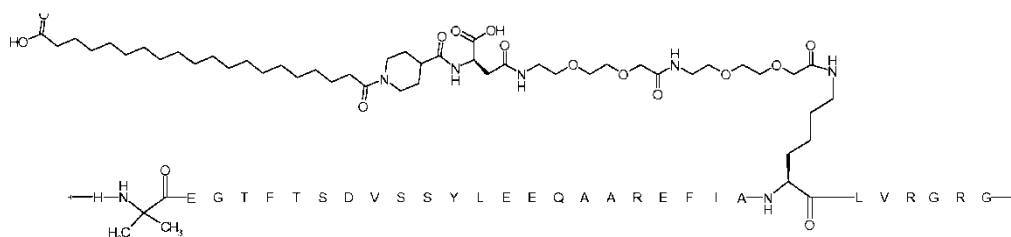
30 Método de preparación: Método A excepto que el péptido se preparó en un Apex396 de Advanced Chemtech mediante el uso de un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo Mtt se desprotegió con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

35 HPLC método I:

RT= 28,4 min
MALDI-MS: 4252,5

40 Ejemplo 6

45 N-épsilon31-(2-[2-(2-[2-(2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxi-nonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)[Aib8, Glu22, Arg26, Lys31, Arg34]GLP-1-(7-37)}

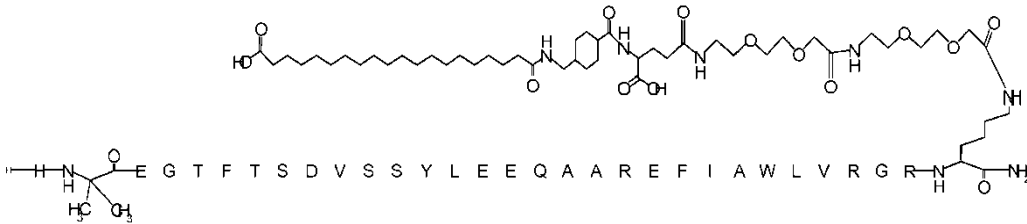


Método de preparación: B

- 5 El péptido se eluyó a 66 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4280,9

Ejemplo de referencia 7

- 10 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida

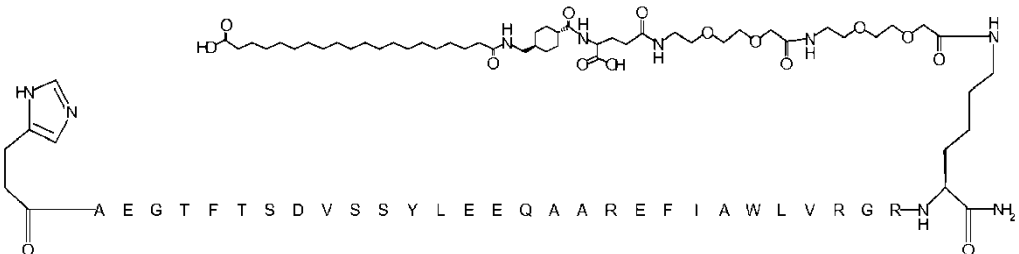


- 15 Método de preparación: B

- 20 El péptido se eluyó a 67 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4451,1

Ejemplo de referencia 8

- 25 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Desamino His7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)amida

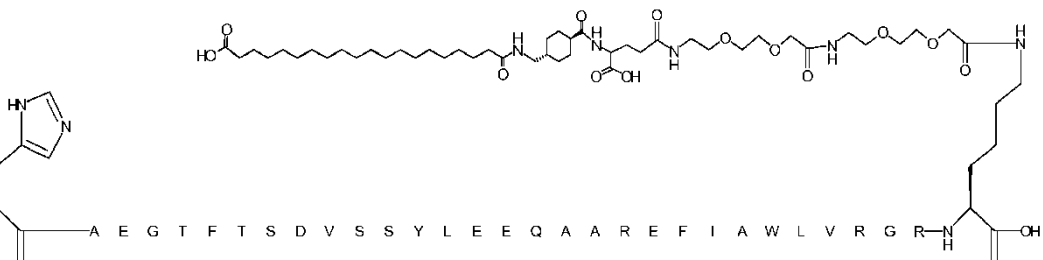


- 30 Método de preparación: B

- 35 El péptido se eluyó a 68 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4422,1

Ejemplo de referencia 9

- 40 N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxi-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Desamino His7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)

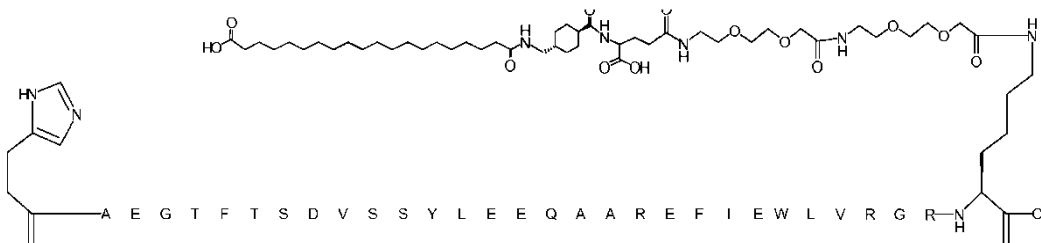


Método de preparación: B

- 5 El péptido se eluyó a 69 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4423,1

Ejemplo de referencia 10

- 10 N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-((trans-4-((19-carboxi-nonadecanoilamino)metil)ciclohexanocarbonil}amino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][Desamino His7,Glu22,Arg26,Glu30,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)

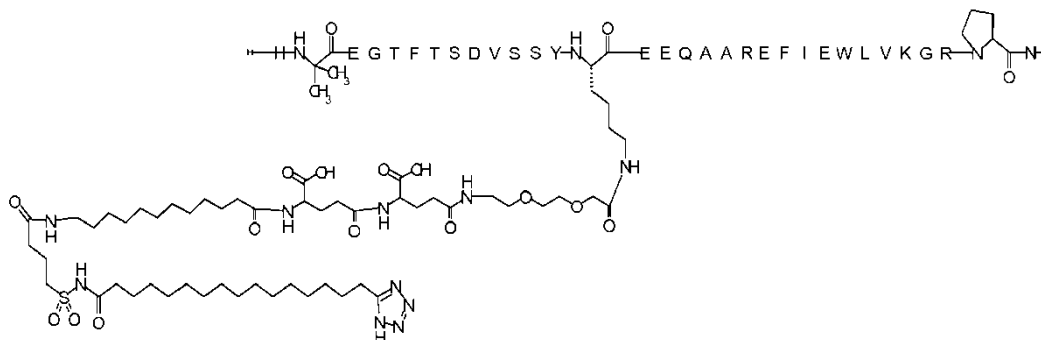


- 15 Método de preparación: B

- 20 El péptido se eluyó a 68 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4481,1

Ejemplo de referencia 11

- 25 N-épsilon20-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol)-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino]dodecanoilamino}butirilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30,Pro37]GLP-1-(7-37)amida

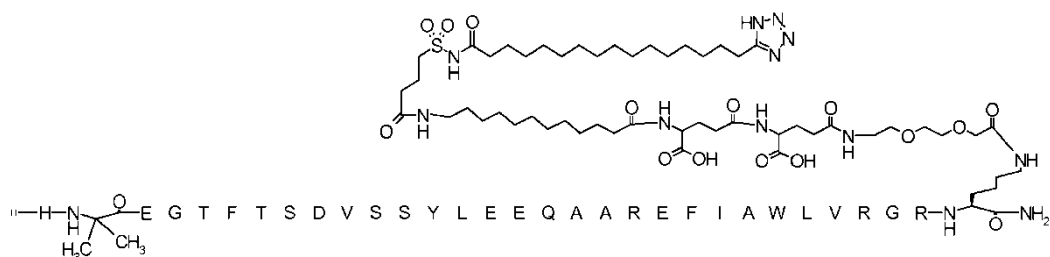


- 30 Método de preparación: B

- 35 El péptido se eluyó a 62 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4638,3

Ejemplo de referencia 12

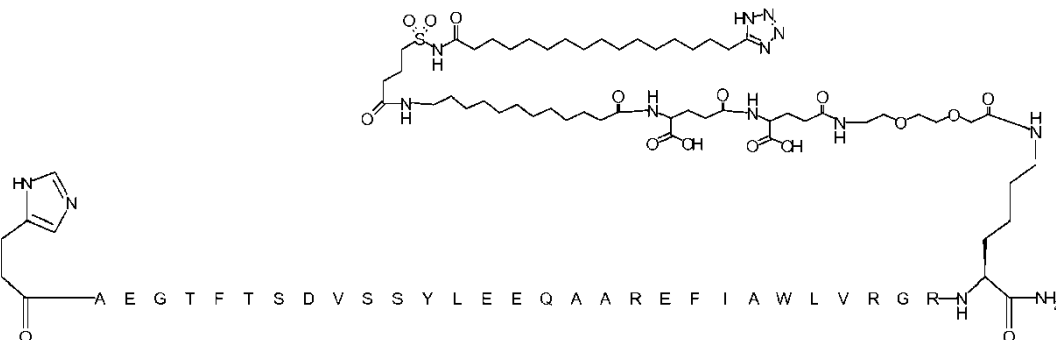
- 40 N-épsilon37-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol)-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino]dodecanoilamino}butirilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)amida



Método de preparación: B

- 5 El péptido se eluyó a 69 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4624,3
Ejemplo de referencia 13

- 10 N-épsilon37-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-{12-[4-(16-(1H-tetrazol)-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butirilamino]dodecanoilamino]butirilamino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetil][DesaminoHis7,Glu2,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)amida

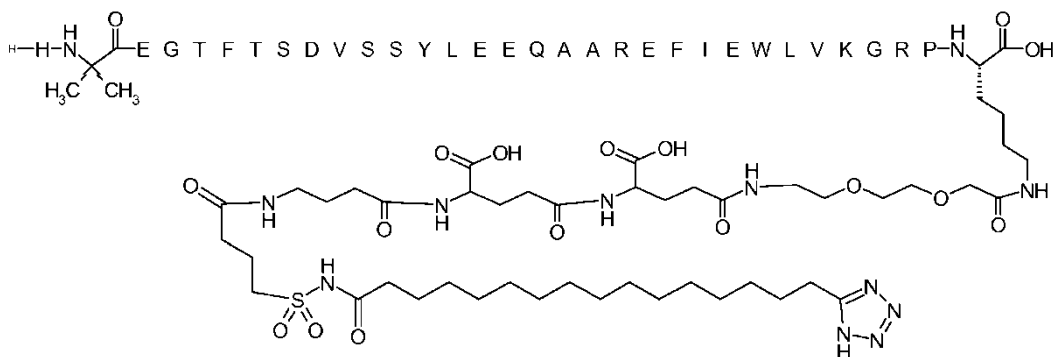


- 15 Método de preparación: B

El péptido se eluyó a 65 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4595,3

- 20 Ejemplo de referencia 14

- 25 [Aib8,Glu22,Arg26,Glu30,Pro37]GLP-1-(7-37) Lys[2-(2-[4-carboxi-4-(4-carboxi-4-[4-[4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil) butirilamino]butirilamino] butirilamino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetil]



- 30 Método de preparación: El péptido se preparó en un Apex396 de Advanced Chemtech y la unión del conector de tioamida se alcanzó en dos etapas. Primero se acopló el ácido 4-sulfamoilbutírico con la resina mediante el uso de DIC y HOAt/HOBt (1:1). Después, se añadió a la resina ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico mezclado con carbonildiimidazol en NMP seguido de la adición de DBU. De cualquier otra manera, es el mismo protocolo descrito al principio de la sección de ejemplo.

- 35 PM calculado = 4640,2

Ejemplo de referencia 15

N-épsilon37 (Polietilenglicol2000) [DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37] GLP-1(7-37) amida

5



Método de preparación: Ruta III

10 HPLC (método A1)

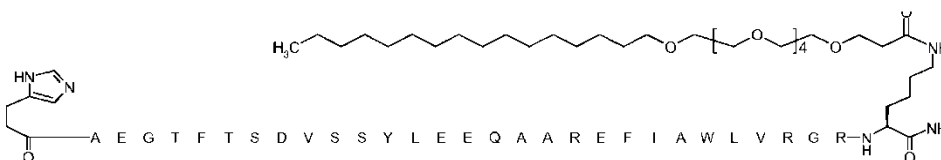
RT = 40,88 min

LCMS: m/z = Heterogéneo pero que corresponde al material de partida + un promedio de 2,000 Calculado (M + H)⁺ = 5,519

15 Ejemplo de referencia 16

N-épsilon37 (3-((2-(2-(2-(2-(2-hexadeciloxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi) propionil)[DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37] GLP-1(7-37)-amida

20



Método de preparación: ruta III

25 HPLC (método B6):

RT= 42,3 min

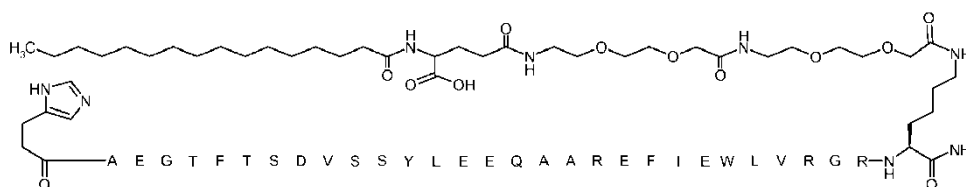
LCMS: m/z = 1353,3 (M+3H)³⁺

Calculado (M+H)⁺ = 4055,7

30 Ejemplo de referencia 17

N-épsilon37-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(hexadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etoxi)etoxi]acetil)etoxi)etoxi]acetil)}-[desaminoHis7,Glu22,Arg26,Glu30,Arg34,Lys37](GLP-1-(7-37)amida

35



Método de preparación: A

40 HPLC (método B6):

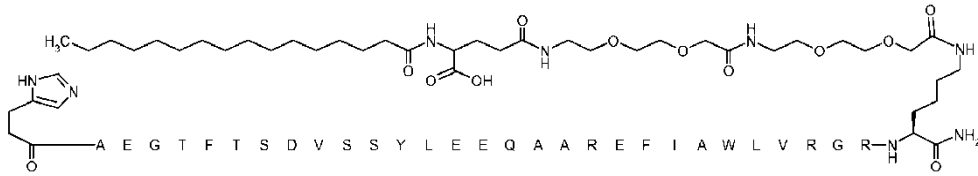
RT= 36,1 min

LCMS: m/z = 1419,0 (M+3H)³⁺

Calculado (M+H)⁺ = 4254,8

Ejemplo de referencia 18

45 N-épsilon37-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(hexadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etoxi)etoxi]acetil)etoxi)etoxi]acetil)}-[desaminoHis7,Glu22, Arg26,Arg34,Lys37] (GLP-1-(7-37)amida

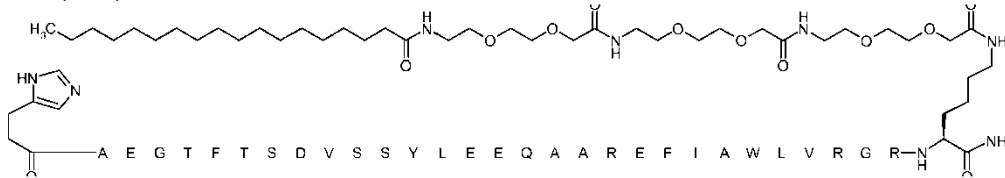


Método de preparación: A

- 5 HPLC (método B6):
RT= 36,06 min
LCMS: m/z = 1399 (M+3H)³⁺
Calculado (M+H)⁺ = 4196,8

10 Ejemplo de referencia 19

N-épsilon37-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(octadecanoilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)[desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1(7-37)amida



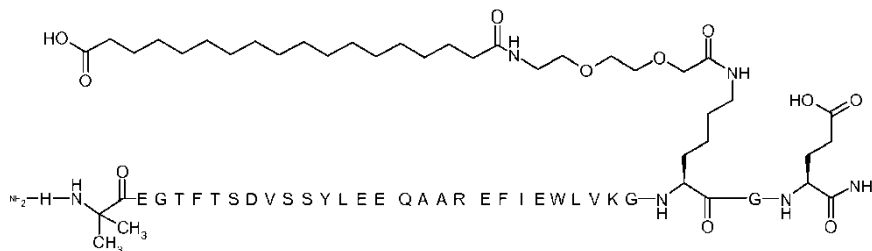
15

Método de preparación: A

- 20 HPLC (método B6):
RT= 40,1 min
LCMS: m/z = 1414,6 (M+3H)³⁺
Calculado (M+H)⁺ = 4240,9

25 Ejemplo de referencia 20

N-épsilon36-(2-(2-(2-((2-[2-(2-(17-carboxiheptadecanoilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi)acetil)[Aib8,Glu22,Arg26,Glu30,Lys36]GLP-1-(7-37)Glu-amida



30

Método de preparación: B

- 35 El péptido se eluyó a 68 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4069,6

Ejemplo de referencia 21

40 N-épsilon37-[4-(16-(1H-Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butiril] [DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)amida

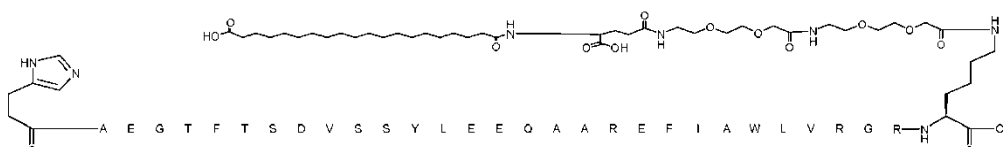


Método de preparación: B

- 5 El péptido se eluyó a 64 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 3994,6

Ejemplo de referencia 22

- 10 N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)

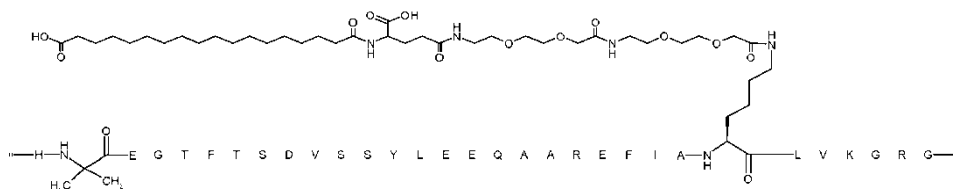


- 15 Método de preparación: B

- El péptido se eluyó a 67 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4283,9

Ejemplo 23

- 25 N-épsilon31-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil] [Aib8,Glu22,Arg26,Lys31]GLP-1-(7-37)



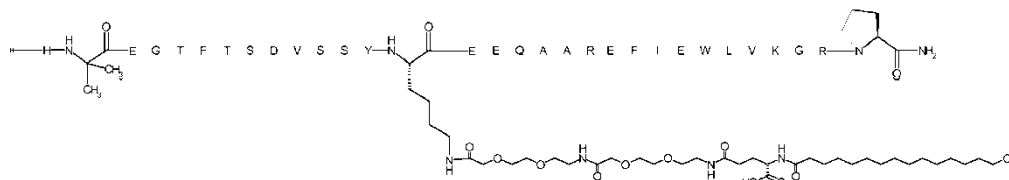
- 30 Método de preparación: Método A excepto que el péptido se preparó en un Apex396 de Advanced Chemtech mediante el uso de un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo Mtt se desprotegió con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

HPLC método I:

- RT= 27,2 min
MALDI-MS: 4127,9

Ejemplo de referencia 24

- 40 N-épsilon20-(2-[2-[2-(2-[2-((S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil] [Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30,Pro37]GLP-1-(7-37)amida



Método de preparación: B

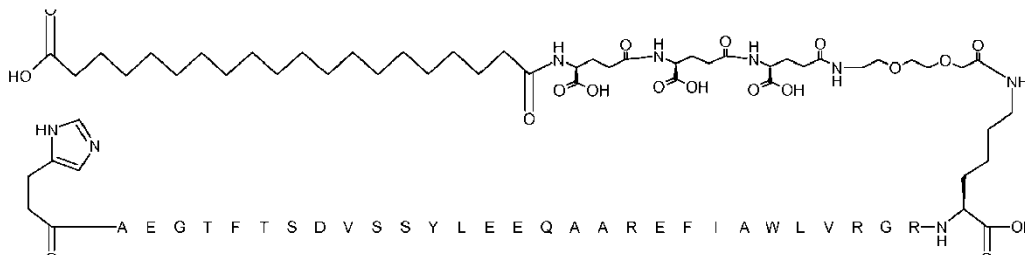
El péptido se eluyó a 66 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4239,8

5

Ejemplo de referencia 25

10

N-épsilon37-(2-{2-[2-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-[(S)-4-carboxi-4-(19)-carboxi-nonadecanoilamino)butirilamino]butirilamino)etoxi]etoxi]acetil)
[DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37)



15 Método de preparación: B

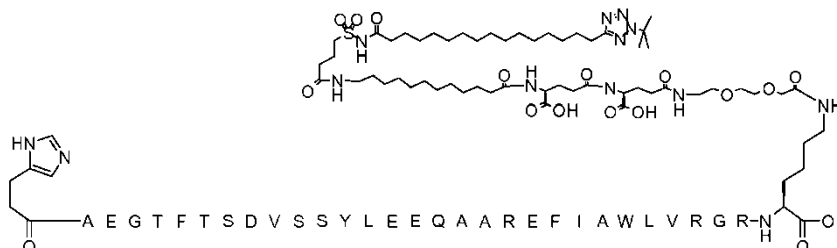
El péptido se eluyó a 65 % de acetonitrilo.
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4397,0

20

Ejemplo de referencia 26

25

N-épsilon37-{2-[2-(2-((S)-4-[(S)-4-(12-{4-[16-(2-terc-butil-2H-tetrazol-5-il)-hexadecanoilsulfamoil]butirilamino)dodecanoilamino)-4-carboxibutirilamino]-4-carboxibutirilamino)etoxi]etoxi]acetil)} [DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37] GLP-1 (7-37)



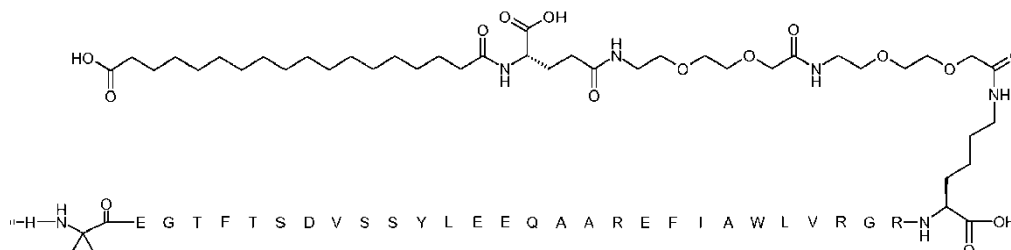
30 Método de preparación B

El péptido se eluyó a 74 % de acetonitrilo
Estructura confirmada mediante MALDI-MS
PM calculado = 4652,4

35 Ejemplo de referencia 27

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-((S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino)-etoxi]-etoxi)-acetilamino]etoxi]-etoxi)-acetil) [Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37).

40



Preparación análoga al SPPS Método B.

HPLC método 02_B6_1:

RT= 34,27 min

LCMS: m/z = 1,072 (M+4H)⁴⁺

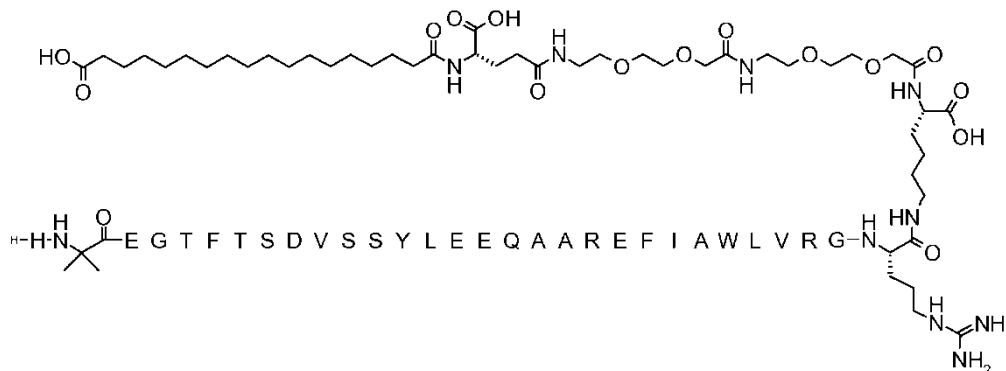
(M) calculada = 4284,9

5

Ejemplo de referencia 28

N-alfa37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil][Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,épsilon-Lys37]péptido GLP-1-(7-37)

10



Preparación análoga al SPPS Método B.

15

HPLC método I_BDSB2:

RT= 10,19 min

LCMS: m/z = 1,072 (M+4H)⁴⁺

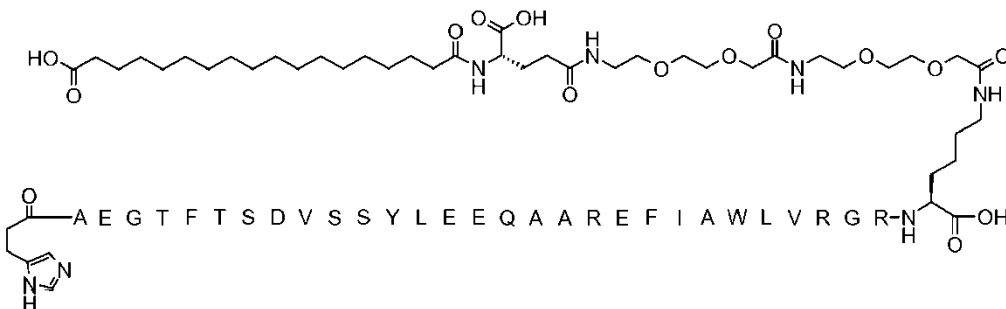
(M) calculada = 4284,9

20

Ejemplo de referencia 29

N-épsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]etoxi)-etoxi)-acetilamino]etoxi)-etoxi)-acetil] [desaminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37] GLP-1-(7-37)

25



Preparación análoga al SPPS Método B.

30

HPLC método I_BDSB2:

RT= 9,96 min

LCMS: m/z = 1,064 (M+4H)⁴⁺

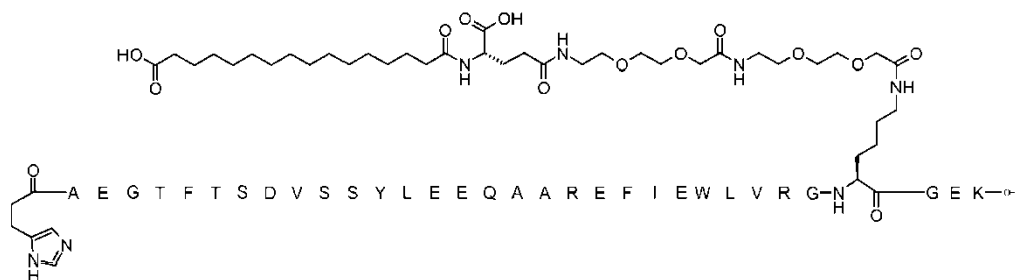
(M) calculada = 4255,8

35

Ejemplo de referencia 30

N-épsilon36-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-butirilamino]etoxi)-etoxi)-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil] [desaminoHis7,Glu22,Arg26,Glu30,Arg34,Lys36]GLP-1-(7-37)-Glu-Lys péptido

40

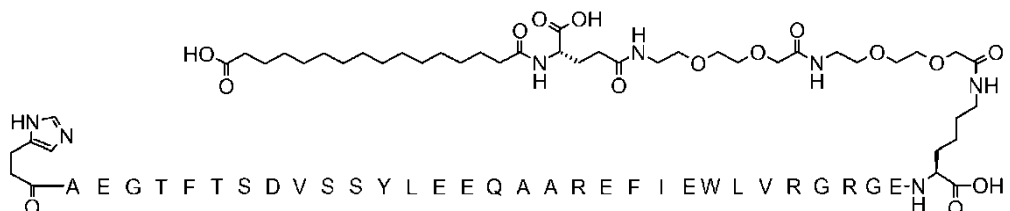


Preparación análoga al SPPS Método B.

- 5 HPLC método I_BDSB2:
RT= 6,40 min
LCMS: m/z = 1,111 (M+4H)⁴⁺
(M) calculada = 4444,0

- 10 Ejemplo de referencia 31

[desaminoHis7, Glu22, Arg26, Glu30, Arg34]GLP-1-(7-37)-Glu-Lys(2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil) péptido



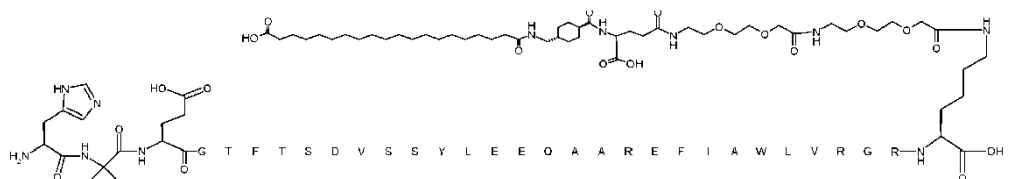
- 15

Preparación análoga al SPPS Método B.

- 20 HPLC método I_BDSB2:
RT= 6,52 min
LCMS: m/z = 1,119 (M+4H)⁴⁺
(M) calculada = 4472

- 25 Ejemplo de referencia 32

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil][Aib 8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)



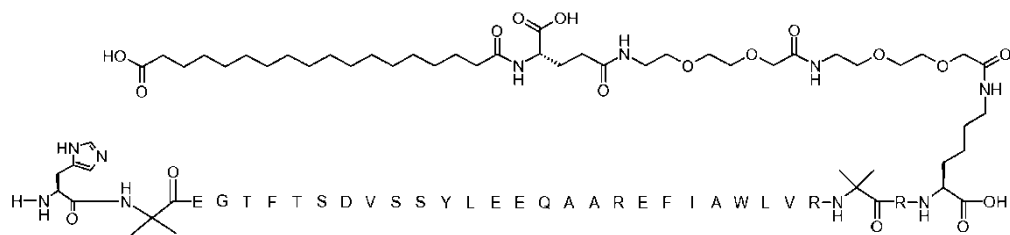
- 30

Preparación análoga al SPPS Método B.

- 35 HPLC método 02_B6_1:
RT= 33,58 min
LCMS: m/z = 1,114 (M+4H)⁴⁺
(M) Calculada = 4451,1

- 40 Ejemplo de referencia 33

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-butirilamino]etoxi]-etoxi]-acetilamino]-etoxi]-etoxi]-acetil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Aib35,Lys37]GLP-1-(7-37)

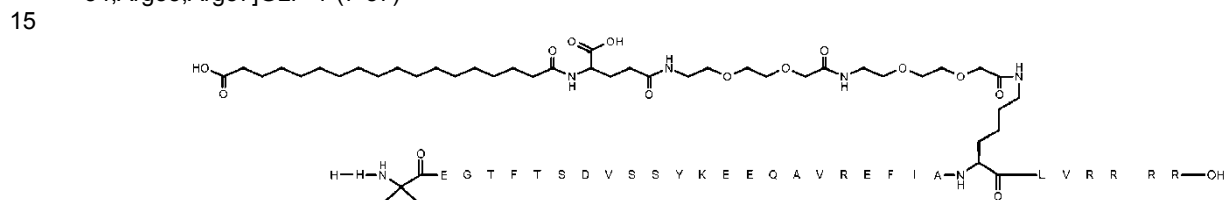


Preparación análoga al SPPS Método B.

- 5 UPLC método 04_A3_1:
RT= 9,81 min
LCMS: m/z = 1,079 (M+4H)⁴⁺
(M) Calculada = 4312,9

10 Ejemplo 34

N-épsilon31-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]GLP-1-(7-37)

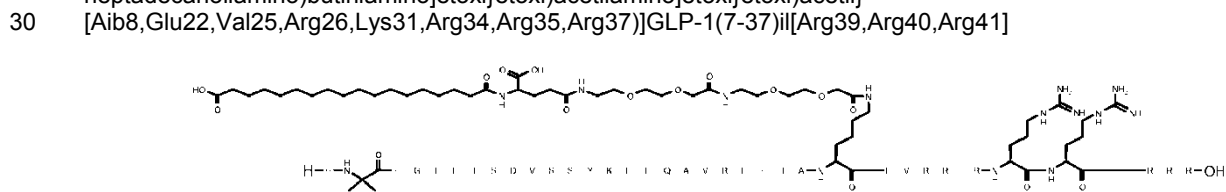


Método de preparación: El péptido se preparó mediante el SPPS Método C y el producto final se caracterizó mediante HPLC analítica y MALDI-MS.

- 20 HPLC (02-B4-4): RT= 7,9 min
HPLC (neutral, 30-60 % durante 16 min): RT= 5,6 min
MALDI-MS: 4,395
PM Calculado = 4,397

25 Ejemplo 35

N-épsilon31[2-(2-[2-(2-[2-[4-carboxi-4-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]GLP-1(7-37)il[Arg39,Arg40,Arg41] (17-carboxi-



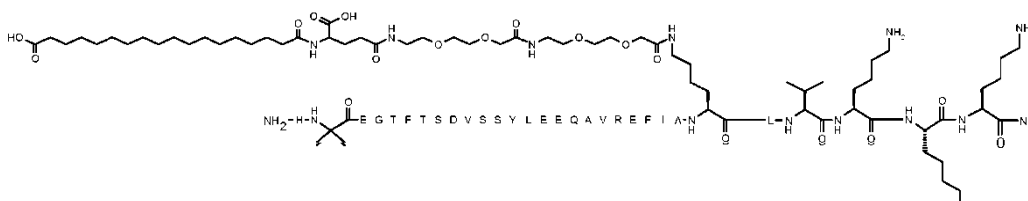
Método de preparación: El péptido se preparó mediante el SPPS Método C y el producto final se caracterizó por HPLC analítica y LC-MS.

- 35 HPLC (02-B4-4): RT= 7,36 min
HPLC (neutral): RT= 17,5 min
MALDI-MS: 5,022
PM calculado = 5021,8

40 Ejemplo 36

N-épsilon31-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]GLP-1-(7-36)amida

- 45



Método de preparación: El péptido se preparó mediante el SPPS Método C y el producto final se caracterizó mediante HPLC analítica y MALDI-MS.

5

HPLC (02-B4-2): RT= 8,4 min

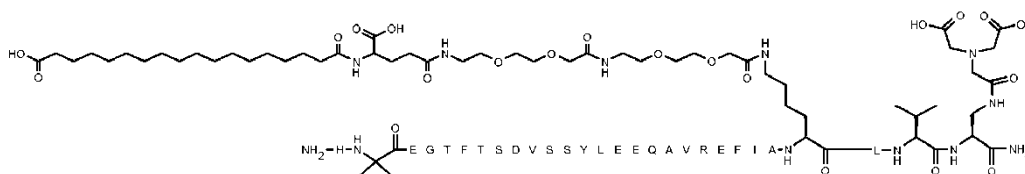
HPLC (04-A3-1): RT= 7,8 min

MALDI-MS: 4,141

PM calculado = 4140,8

10

Ejemplo 37



15

N-épsilon31-{2-(2-{2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-N-beta34-(2-(bis-carboximetilamino)acetil)[Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Dap34]GLP-1(7-34)amida

Método de preparación: El péptido se preparó mediante el SPPS Método C y el producto final se caracterizó mediante HPLC analítica y MALDI-MS.

20

HPLC (02-B6-1): RT= 36,7 min

HPLC (A4-A3-1): RT= 8,9 min

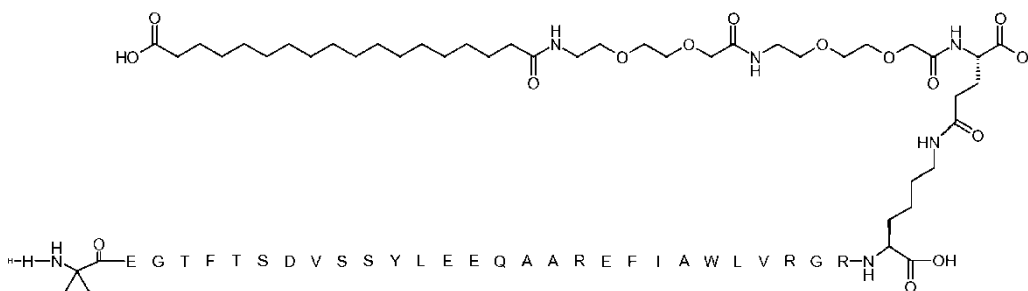
MALDI-MS: 4015,9

PM calculado = 4015,5

25

Ejemplo de referencia 38

N-épsilon-37-[(S)-4-carboxi-4-(2-[2-[2-(2-[2-(17-carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetilamino)butiril] [Aib8,Glu22,Arg26,34,Lys37] GLP-1(7-37)



30

Preparación análoga a SPPS Método B.

UPLC método 04_A3_1:

RT= 10,26 min

35

LCMS: m/z = 1071,7 (M+4H)⁴⁺

(M) calculada = 4284,9

Hallazgos biológicos

40

Prolongación de la acción de los derivados de GLP-1 después de la administración i.v. o s.c.

La prolongación de la acción de una serie de derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse mediante el monitoreo de su concentración plasmática después de la administración s.c. a cerdos sanos, mediante el uso de los métodos descritos a continuación. Para la comparación puede seguirse, además, la concentración plasmática de

GLP-1(7-37) después de la administración s.c. La prolongación de la acción de otros derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse de la misma manera.

Ejemplo 39: Evaluación farmacocinética en minicerdos

Una serie de derivados de GLP-1 de la invención (los compuestos de los Ejemplos 1, 4, 5, 7, 8, 9, 13 y 22) se sometieron a evaluación farmacocinética en minicerdos. Se incluyó en la prueba la liraglutida con fines comparativos. Se incluyó, además, un segundo compuesto comparativo, a saber, un derivado de GLP-1 con las sustituciones (22E+26R), que se describe en el Ejemplo 63 del documento WO 2005/027978.

Generalmente, las sustancias de prueba deben disolverse en un vehículo adecuado para la administración subcutánea o intravenosa. La concentración debe ajustarse para que el volumen de dosificación sea aproximadamente 1 ml. En el presente estudio, las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea.

El estudio se realizó en 12 minicerdos Göttingen machos de Ellegaard Göttingen Minipigs ApS. Se permitió un período de aclimatación de aproximadamente 10 días antes de que los animales ingresaran al estudio. Al comienzo del período de aclimatación, los minicerdos tenían alrededor de 5 meses de edad y en el intervalo de peso de 8-10 kg.

El estudio se realizó en una habitación para animales adecuada con una temperatura ambiente fijada a 21-23 °C y la humedad relativa a ≥ 50 %. La habitación se iluminó para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La iluminación fue de 06.00 a 18.00 h. Los animales se alojaron en corrales con paja como lecho, seis juntos en cada corral. Los animales tuvieron acceso libre a agua para beber de calidad doméstica durante el estudio, pero se les sometió a ayuno desde aproximadamente las 4 pm del día anterior a la administración hasta aproximadamente 12 horas después de la administración. Los animales se pesaron al llegar y en los días de dosificación.

Los animales recibieron una única inyección subcutánea. La inyección subcutánea se administró en el lado derecho del cuello, aproximadamente a 5-7 cm de la oreja y a 7-9 cm del centro del cuello. Las inyecciones se administraron con un tapón de goma en la aguja, lo que permitió introducir 0,5 cm de la aguja. Cada sustancia de prueba se administró a tres animales. Cada animal recibió una dosis de 2 nmol/kg de peso corporal. Se dosificaron seis animales por semana, mientras los seis restantes descansaban.

Se obtuvo un perfil completo de concentración plasmática-tiempo de cada animal. Las muestras de sangre se recolectaron de acuerdo con el cronograma siguiente:

Después de la administración intravenosa (no aplicable en el estudio actual):

Predosis (0), 0,17 (10 minutos), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección.

Después de la administración subcutánea:

Predosis (0), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección. En cada tiempo de toma de muestra, se extrajeron 2 ml de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se tomaron de la vena yugular.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de ensayo que contenían un tampón para la estabilización para evitar la degradación enzimática de los derivados de GLP-1.

El plasma se transfirió inmediatamente a tubos Micronic. Se transfirieron aproximadamente 200 μ l de plasma a cada tubo Micronic. El plasma se almacenó a -20 °C hasta que se analizó. Las muestras de plasma se analizaron para determinar el contenido de derivados de GLP-1 mediante el uso de un inmunoensayo.

Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental. Se calcularon en cada ocasión los parámetros farmacocinéticos siguientes: AUC, AUC/Dosis, AUC% de Extrap, $C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$, λ_z , $t_{1/2}$, CL, CL/f, V_z , V_z/f y MRT.

Todos los derivados de GLP-1 de la invención evaluados tuvieron una vida media después de la administración subcutánea en minicerdos en el intervalo de 40-100 horas. Las vidas medias de los compuestos comparativos liraglutida y Compuesto 135 fueron de 18 horas y 28 horas, respectivamente.

Los derivados seleccionados de la invención se prueban en cerdos Danish Landrace.

Evaluación farmacocinética de los derivados de GLP-1 en cerdos

Los cerdos (50 % Duroc, 25 % Yorkshire, 25 % Danish Landrace, de aproximadamente 40 kg) se dejaron en ayunas desde el comienzo del experimento. A cada cerdo se le administran 0,5 nmol del derivado de prueba por kg de peso corporal en una solución isotónica 50 μ M (fosfato 5 mM, pH 7,4, Tween®-20 al 0,02 % (Merck), manitol 45 mg/ml

ES 2 672 770 T3

(libre de pirógenos, Novo Nordisk). Se extraen muestras de sangre de un catéter en la vena yugular. Se vierten 5 ml de las muestras de sangre en recipientes de vidrio refrigerados que contienen 175 µl de la solución siguiente: EDTA 0,18 M, aprotinina 15,000 KIE/ml (Novo Nordisk) y valina-pirrolidida 0,30 mM (Novo Nordisk), pH 7,4. Dentro de 30 min, las muestras se centrifugan durante 10 min a 5-6,000*g. La temperatura se mantiene a 4 °C. El sobrenadante se pipetea en diferentes recipientes de vidrio y se mantiene a -20 °C hasta su uso.

Las concentraciones plasmáticas de los péptidos se determinan en un ELISA sándwich o por RIA mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales diferentes. La elección de los anticuerpos depende de los derivados de GLP-1. El tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima varía dentro de amplios límites, en dependencia del derivado de GLP-1 particular seleccionado.

Protocolo del ensayo general para ELISA Sandwich en placa de microtitulación de 96 pocillos

Tampón de recubrimiento (PBS)	: solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2
Tampón de Lavado (PBS-lavado)	: solución salina tamponada con fosfato, Tween 20 al 0,05 % v/v, pH 7,2
Tampón del ensayo (BSA-tampón)	: solución salina tamponada con fosfato, Albúmina Sérica Bovina (Fluka 05477) 10 g/l, Tween 20 al 0,05 % v/v, pH 7,2
Tampón con estreptavidina	Solución salina tamponada con fosfato, NaCl 0,5 M, Tween 20 al 0,05 % v/v, pH 7,2
Estándar	: Derivados individuales en una matriz de plasma
A-TNP	: Anticuerpos sin sentido
AMDEX	: Estreptavidina-peroxidasa de rábano (Amersham RPN4401V)
Substrato TMB	: 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (<0,02 %), peróxido de hidrógeno

El ensayo se llevó a cabo de la manera siguiente (volumen/pocillo):

1.) cubrir con 100 µl de anticuerpo de captura 5 µg/ml en PBS-tampón

- incubar durante toda la noche, 4 °C
- 5× PBS-lavado
- se bloqueó con el último lavado en un mínimo de 30 minutos
- vaciar después la placa

2.) 20 µl de muestra + 100 µl de anticuerpo de detección biotilado 1 µg/ml en BSA-tampón con A-TNP 10 µg/ml

- incubar 2 h, a temperatura ambiente, en un agitador → 5× PBS-lavado, vaciar después la placa

3.) 100 µl de AMDEX 1:8,000 en tampón con estreptavidina

- incubar durante 45-60 minutos, a temperatura ambiente, en un agitador
- 5× PBS-lavado, vaciar después la placa

4.) 100 µl de sustrato TMB

- incubar x minutos a temperatura ambiente en un agitador
- detener la reacción con 100 µl de H₃PO₄ 4 M

Leer la absorbancia a 450 nm con 620 nm como referencia

La concentración en las muestras se calculó a partir de curvas estándar.

Protocolo de ensayo general para RIA

Tampón de DB: tampón de fosfato 80 mM, albúmina sérica humana al 0,1 %, EDTA 10 mM, tiomersal 0,6 mM, pH 7,5

Tampón de FAM: tampón de fosfato 40 mM, albúmina sérica humana al 0,1 %, tiomersal 0,6 mM, pH 7,5

ES 2 672 770 T3

Carbón: tampón de fosfato 40 mM, tiomersal 0,6 mM, 16,7 % de plasma bovino, 15 g/l de carbón activado, pH 7,5 (mezcle la suspensión como mínimo 1 h antes de usar a 4 °C)

Estándar: Derivados individuales en una matriz de plasma

5

El ensayo se llevó a cabo en tubos minisorp 12×75 mm (volumen/tubo) de la manera siguiente:

10

15

20

25

30

35

	Tampón de DB	MUESTRA	Anticuerpo	Tampón de FAM	Trazador	Carbón	H ₂ O
Día 1							
Total					100 µL		
NSB	330 µL			100 µL			
Muestra	300 µL	30 µL	100 µL		100 µL		
Mezclar, incubar durante toda la noche a 4 °C							
Día 2							
Total							1,5 mL
NSB						1,5 mL	
Muestra						1,5 mL	

40

Mezclar e incubar durante 30 minutos a 4°C - centrifugar a 3,000 rpm, 30 minutos - inmediatamente después transferir los sobrenadantes a tubos nuevos, cerrar con un tapón de goma y contar en un contador gamma durante 1 minuto.

La concentración en las muestras se calculó a partir de curvas estándar individuales.

45

Ensayo de radio receptor (RRA, por sus siglas en inglés) de GLP-1:

50

El método es un ensayo radiométrico de unión a ligando mediante el uso de partículas para obtención de imágenes mediante LEADseeker. El ensayo se compone de fragmentos de membrana que contienen el receptor GLP-1, análogos de GLP-1 no etiquetados, GLP-1 humano etiquetado con ¹²⁵I y partículas PS para LEADseeker recubiertas con aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés). El GLP-1 frío y etiquetado con ¹²⁵I competirá por la unión al receptor. Cuando se añaden las partículas para LEADseeker, se unirán a los residuos de carbohidratos en los fragmentos de membrana a través de los residuos de WGA. La proximidad entre las moléculas ¹²⁵I y las partículas de LEADseeker provoca la emisión de luz de las partículas. El LEADseeker obtendrá una imagen de la luz emitida y la correlacionará reversiblemente con la cantidad de análogo de GLP-1 presente en la muestra.

55

Reactivos y materiales:

60

Tratamiento previo del plasma animal: El plasma animal se trató con calor durante 4 horas a 56 °C y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se añadió Val-Pyr (10 µM) y aptenina (500 KIE/mL) y se almacenó a <-18 °C hasta su uso.

Calibradores de análogos de GLP-1: se añadieron cantidades conocidas de análogos de GLP-1 al plasma tratado con calor para producir líneas de dilución que variaran de aproximadamente 1 µM hasta 1 µM.

65

Tampón del ensayo de RRA para GLP-1: Na-HEPES 25 mM (pH = 7,5), CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 50 mM, ovoalbúmina al 0,1 %, Tween 20 al 0,003 %, bacitracina al 0,005 %, NaN₃ al 0,05 %.

ES 2 672 770 T3

Suspensión del receptor de GLP-1: Se purificaron fragmentos de membrana del receptor de GLP-1 de células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresan establemente el receptor GLP-1 pancreático humano. Se almacenaron a <-80 °C hasta su uso.

5 Perlas para obtención de imágenes de LEADseeker de poliestireno acoplados a WGA (RPNQ0260, Amersham): Las perlas se reconstituyeron con tampón de ensayo de RRA para GLP-1 hasta una concentración de 13,3 mg/ml. Se añadió después la suspensión de membrana de receptor de GLP-1 y se incubó en frío (2-8 °C), y se invirtió durante al menos 1 hora antes de su uso.

10 125 I-GLP-1(7-36)amida (Novo Nordisk A/S). Se almacenó a <-18 °C hasta su uso.

Etanol 99,9 % vol (De Dansk Spritfabrikker A/S): Se almacenó a <-18 °C hasta su uso.

15 Placas de PTFE hidrófobas MultiScreen® Solvinert de 0,45 μ m (MSRPN0450, Millipore Corp.) Placas de polipropileno (núm. de catálogo 650201, Greiner Bio-One)

Placas de poliestireno blancas de 384 pocillos (núm. de catálogo 781075, Greiner Bio-One)

20 Aparatos:

Mezclador de placas horizontal

Centrífuga con un conjunto de rotor para placas de microtitulación de cubo basculante estándar

Concentrador de muestras por secado UltraVap (Porvair)

25 Sistema de obtención de imágenes multimodalidad LEADseeker™ (Amersham)

Procedimiento de ensayo:

Preparación de la muestra:

30 Monte la placa de filtro MultiScreen® Solvinert en una placa receptora comparable químicamente (es decir, placas de polipropileno) para recoger el filtrado.

35 Añada 150 μ L de etanol helado al 99,9 % en los pocillos vacíos de la placa de filtro MultiScreen® Solvinert, seguido de 50 μ L de calibrador o muestra de plasma. Coloque la tapa de almacenamiento sobre la placa del filtro.

Incubar 15 minutos a 18-22 °C en un mezclador de placa horizontal.

40 Coloque el filtro y la placa receptora ensamblados, con la tapa, dentro de un conjunto de rotor de placa de microtitulación de cubo basculante estándar. El filtrado se recoge después en los pocillos vacíos de la placa receptora a 1,500 rpm durante 2 minutos.

45 Seque el filtrado mediante el uso de UltraVap con N_2 calentado (40 °C) durante 15 minutos. Reconstituya el material seco mediante la adición de 100 μ L de tampón de ensayo de RRA para GLP-1 en cada pocillo. Incubar durante 5 minutos en un mezclador horizontal.

Ensayo radiorreceptor de GLP-1:

Utilice el siguiente esquema de pipeteo y placas de poliestireno blancas de 384 pocillos:

- 50
- 35 μ L de tampón del ensayo de RRA para GLP-1
 - 5 μ L de filtrado reconstituido.
 - 10 μ L de 125 I-GLP-1(7-36)amida. La solución madre se diluyó en tampón del ensayo de RRA para GLP-1 a 20,000 cpm/pocillo antes de su uso.
 - 55 • 15 μ L de fragmentos de membrana de receptor de GLP-1 ($\approx 0,5$ μ g/pocillo) recubiertos previamente sobre perlas de obtención de imágenes para LEADseeker de WGA-poliestireno (0,2 mg/pocillo)

Selle las placas e incube durante toda la noche a 18-22 °C.

60 La emisión de luz de cada pocillo se detecta mediante el uso del sistema de obtención de imágenes multimodalidad LEADseeker™ durante 10 minutos.

Ejemplo 40: Estimulación de la formación de cAMP en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado

65

Se determinaron las potencias de varios derivados de GLP-1 de la invención como se describe a continuación, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano. Para la comparación se determinaron, además, las potencias de dos derivados de GLP-1 conocidos, a saber, la de la liraglutida, y la del Compuesto 135, un derivado de GLP-1 con las sustituciones (22E+26R), que se describe en el Ejemplo 63 del documento WO 2005/027978.

Las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable, BHK467-12A (tk-ts13), que expresa el receptor GLP-1 humano, se estimularon con el derivado de GLP-1 en cuestión, y la potencia de la producción de cAMP se midió mediante el uso del kit de ensayo de cAMP AlphaScreen™ de Perkin Elmer Life Sciences.

Se ha preparado una línea celular transfectada estable en NN A/S, Dinamarca, y se seleccionó un clon de expresión alta para el tamizaje. Las células se cultivaron a CO₂ al 5 % en DMEM, FCS 5 %, Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 0,5 mg/ml del marcador de selección G418.

Las células a una confluencia aproximada del 80 % se lavaron 2 veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se cosecharon con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugaron 5 min a 1,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las etapas adicionales se hicieron todas en hielo. El sedimento celular se homogeneizó mediante Ultrathurax durante 20-30 segundos en 10 ml de Tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH = 7,4), se centrifugó 15 minutos 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 segundos y se centrifugó durante 15 minutos a 20,000 rpm. La suspensión en Tampón 2, homogeneización y centrifugación se repitieron una vez y las membranas se resuspendieron en Tampón 2 y estuvieron listas para un análisis posterior o se almacenaron a -80 °C.

El ensayo funcional del receptor se llevó a cabo mediante la medición de la producción de cAMP inducida por el péptido mediante The AlphaScreen Technology. El principio básico de AlphaScreen Technology es una competencia entre el cAMP endógeno y el cAMP-biotina añadido exógenamente. La captura de cAMP se alcanza mediante el uso de un anticuerpo específico conjugado a perlas receptoras. El cAMP formado se contó y midió en un analizador de microplacas AlphaFusion. Los valores de CE₅₀ se calcularon mediante el uso del programa informático Graph-Pad Prisme (versión 5).

Tabla 1: Potencia de los derivados de GLP-1

Compuesto de ejemplo Núm.	Potencia [CE ₅₀ /nM]
1	0,37
2	0,20
3	0,35
4	0,52
5	0,20
6	0,18
7	0,58
8	0,66
9	0,50
10	0,66
11	0,61
12	1,80
13	1,97
14	0,29
15	0,03
16	0,15
17	0,16
18	0,02
19	0,05
20	0,22
21	1,27
22	1,35
23	0,02
24	0,01
25	0,36
26	0,25
27	0,05
28	0,08
29	0,10
30	0,21
31	0,04
32	0,46
33	0,06
34	1,27

(continuación)

Compuesto de ejemplo Núm.	Potencia [CE ₅₀ /nM]
35	0,74
36	0,14
37	0,34
38	0,07
Liraglutida	0,10
Compuesto 135	4,00

Como es evidente a partir de la Tabla 1, muchos de los derivados de GLP-1 son más potentes que el derivado de GLP-1 de liraglutida de la técnica anterior (cuanto menor es el valor de CE₅₀ mejor). Todos los derivados de GLP-1 de la invención son mucho más potentes que el Compuesto 135.

Ejemplo 41: Afinidad de unión a la albúmina

Las afinidades de varios derivados de GLP-1 de la invención por la albúmina sérica humana (HSA) se midieron mediante un ensayo de competencia de centelleo por proximidad (SPA, por sus siglas en inglés) como se describe a continuación.

Se incubaron perlas de estreptavidina-SPA (GE Healthcare RPNQ0009) con HSA biotinilada durante 5 horas. Las perlas se lavaron con tampón para eliminar la HSA no unida. Las perlas se mezclaron con un análogo de GLP-1 acilado etiquetado con ¹²⁵I (N-épsilon37-[2-(2-[2-((S)-4-((S)-4-(12-[4-(16)]-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butirilamino]dodecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)-4-carboxibutirilamino)etoxi]etoxi)acetil][Aib8,²⁵-Tyr19, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37] GLP-1(7-37)-NH₂) en un tampón que contenía Hepes 100 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Tween-20 al 0,025 %, pH 7,4. La mezcla se pipeteó a los pocillos de Perkin Elmer Optiplat-96 6005290 (100 µl por pocillo) y se añadieron en el mismo tampón 100 µl de una serie de diluciones del derivado de GLP-1 a medir. Después de 20 horas de balanceo suave a temperatura ambiente, las placas se centrifugaron y se contaron en un TopCounter. Se graficó la cpm unida como una función de la concentración del derivado de GLP-1 y se usó el valor de CE₅₀ de la curva de competencia como una medida de la afinidad del derivado por la HSA.

Las afinidades de unión a la albúmina (CE₅₀, en nM) de diversos derivados de GLP-1 de la invención se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Afinidad de unión a la albúmina

Compuesto de ejemplo Núm.	Afinidad de unión a la albúmina (EC ₅₀ /nM)
11, 26, 32	1-100
5, 13, 27, 33	100-150
14, 25, 37	150-200
2, 4, 6, 20, 28	200-400
1, 22, 29, 36	400-800
7, 9, 12, 35	800-1500
3, 8, 23, 24, 31	1500-2000
18, 21, 30, 34	superior a 2,000

Como resulta evidente a partir de la Tabla 2, varios de los derivados de GLP-1 de la invención tienen una afinidad alta de unión a la albúmina que corresponde a una CE₅₀ inferior a 2,000 nM (cuanto menor la CE₅₀, mayor la afinidad de unión a la albúmina).

Ejemplo 42: Unión al dominio extracelular del receptor GLP-1

Para una serie de derivados de GLP-1 de la invención (los compuestos de los Ejemplos 1, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 y 24), se midió la afinidad de la unión al dominio extracelular N-terminal aislado del receptor GLP-1R (nGLP-1R), como se describe a continuación. Se incluyó la liraglutida para la comparación.

La afinidad es una medida de la capacidad del derivado de GLP-1 en cuestión para desplazar a la ¹²⁵I-Exendina-4 (9-39) de la unión a nGLP-1R, y la unión a nGLP-1R se midió en el ensayo siguiente: La proteína nGLP-1R se preparó como se describió por Runge y otros 2007 (Biochemistry, volumen 46, pp. 5,830-5,840), se biotiniló y se

inmovilizó en perlas de SPA recubiertas con estreptavidina. La nGLP1R en NaHCO₃ 0,1 M se biotiniló mediante el uso de 75 µg de BNHS (Sigma H1759) para 1 mg de proteína. El nGLP1R biotinilado se dializó subsecuentemente contra a PBS. Todos los reactivos y derivados se diluyeron en PBS con Tween 20 al 0,05 % v/v. El ensayo de unión se llevó a cabo en placas OptiPlates de 96 pocillos (PerkinElmer 6005290) en un volumen final de 200 µl. Cada pocillo contenía 2 mg de perlas de SPA recubiertas con estreptavidina (PerkinElmer RPNQ007), 0,1 pmol de nGLP1R biotinilada, 50 pCi de Exendina-¹²⁵ (9-39) y el péptido de prueba en concentraciones finales que varían de 1,000 nM a 0,064 nM. Las placas se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 3 horas. Las partículas de SPA se sedimentaron por centrifugación durante 10 minutos a 1,500 rpm y las placas se contaron en un TopCount-NXT (PerkinElmer).

El valor de CI₅₀ se lee de la curva respectiva como la concentración del derivado de GLP-1 en cuestión que desplaza el 50 % de la ¹²⁵I-Exendina-4 (9-39) de la unión a nGLP-1R.

La afinidad de la liraglutida al nGLP-1R (CI₅₀) se determinó a 1,500 nM. Los derivados de GLP-1 evaluados de la invención tenían afinidades que variaban de 2,0 - 276 (nM), con seis compuestos en el intervalo de 2,0-10,0 nM. Todos los derivados de GLP-1 de la invención evaluados exhiben en consecuencia una afinidad de unión mejorada al receptor de GLP-1 N-terminal, con relación a la liraglutida (cuanto menor el valor de CI₅₀, mejor la unión).

Ejemplo 43: Estudio dosis-respuesta en ratones db/db

Se evaluaron varios derivados de GLP-1 de la invención (los compuestos de los Ejemplos 1, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 20, 22 y 27) en un estudio dosis-respuesta en un modelo de ratón obeso y diabético (ratones db/db) como se describe a continuación.

Cincuenta ratones db/db (Taconic, Dinamarca), de 10-12 semanas de edad, se alojaron de acuerdo con las normas de bienestar animal estándar de Novo Nordisk y se les dio acceso libre a alimento estándar (por ejemplo, Altromin 1324, Brogaard, Gentofte, Dinamarca) y agua del grifo y se mantuvieron a 24 °C. Después de 1 semana de aclimatación, se evaluó dos veces la glucosa sanguínea basal. En base a la media de los valores de glucosa en sangre, se seleccionaron 42 ratones para experimentación posterior y se asignaron a 7 grupos (n = 6) con niveles de glucosa concordantes. Los ratones se usaron en experimentos de 3-6 días de duración hasta 4 veces, después de lo cual se sacrificaron por eutanasia.

Los siete grupos recibieron tratamiento de la siguiente manera:

- 1: Vehículo, s.c.
- 2: Derivado de GLP-1, 0,3 nmol/kg, s.c.
- 3: Derivado de GLP-1, 1 nmol/kg, s.c.
- 4: Derivado de GLP-1, 3 nmol/kg, s.c.
- 5: Derivado de GLP-1, 10 nmol/kg, s.c.
- 6: Derivado de GLP-1, 30 nmol/kg, s.c.
- 7: Derivado de GLP-1, 100 nmol/kg, s.c.

Vehículo: fosfato 50 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 8. El derivado de GLP-1 se disolvió en el vehículo, por ejemplo, a concentraciones de 0,05, 0,17, 0,5, 1,7, 5 y 17 nmol/ml y se administraron 300 microlitros s.c. por ratón de peso 50 g (6 ml/kg).

El día de la administración de la dosis, el compuesto en cuestión se administró aproximadamente a las 9 a.m. (tiempo 0). En el tiempo -½ h (8.30 a.m.) se evaluó la glucosa en sangre, después de lo cual se pesaron los ratones. La glucosa en sangre se evaluó varias veces el día de la administración de la dosis, por lo general en los tiempos 1, 3 y 6 h (10 a.m., 12 a.m. y 3 p.m.).

En los días siguientes, se evaluó la glucosa en sangre a los tiempos 24, 48, 72 y 96 h después de la administración (es decir, a las 9 a.m. del día 2, 3, 4, 5), seguido de pesaje. En algunos estudios, la glucemia y el peso corporal se evaluaron además a las 120 h (día 6) después de la administración.

Los ratones se pesaron individualmente en una pesa digital.

Las muestras para la medición de la glucosa en sangre se obtuvieron del capilar de la punta de la cola de ratones conscientes. Se recogió sangre, 10 µl, en capilares heparinizados y se transfirió a 500 µl de tampón de glucosa (solución de tampón EBIO, Eppendorf, Alemania). La concentración de glucosa se midió mediante el uso del método de glucosa oxidasa (analizador de glucosa Biosen 5040, EKF Diagnostic, GmbH, Barleben, Alemania). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante hasta 1 h hasta el análisis. Si fue necesario posponer el análisis, las muestras se mantuvieron a 4 °C durante un máximo de 24 h.

Las vidas medias (T_½) se calcularon de acuerdo con el modelo matemático siguiente: Mediante la suposición de que

- (1) la desaparición de los compuestos del plasma es monoexponencial;
 (2) el efecto sobre la glucosa en sangre (deltaBG) puede describirse mediante una curva dosis-respuesta sigmoidal estándar;
 (3) las primeras 6 horas de absorción y distribución se ignoran y solo se ajusta el retorno de la glucosa desde el punto inferior hasta la línea base (mínimo hasta 0);

después la respuesta de la glucosa (Y) (por ejemplo, deltaBG) puede describirse mediante la ecuación siguiente:

$$Y = \text{Punto inferior} + (\text{Punto superior} - \text{Punto inferior}) / (1 + \text{Dosis} * \exp(-\ln 2 * t / T_{1/2}) / \text{ED50}),$$

donde las variables ED50 y $T_{1/2}$ se definen como sigue:

ED50 es la dosis que da lugar a la mitad del efecto máximo sobre la glucemia (en inglés BG) (en nmol/kg)

$T_{1/2}$ es la vida media (en horas); y las siguientes son constantes globales:

Punto superior (la respuesta después del retorno a la glucosa basal), y punto inferior (la respuesta a la caída máxima de la glucosa); y la siguiente es una constante para cada conjunto de datos (cada dosis): Dosis (la dosis administrada (en nmol/kg)).

Todos los conjuntos de datos se ajustan simultáneamente.

Todos los compuestos evaluados tenían una vida media ($T_{1/2}$) en el intervalo de 10-30 horas.

Ejemplo 44: Contenido de alfa-hélice

Se estimó el contenido de estructura α -helicoidal (alfa-helicoidal) para una serie de derivados de GLP-1 de la invención (los compuestos de los Ejemplos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 21, 22, y 24) mediante el uso de espectroscopia de dicroísmo circular (DC), como se describe a continuación. Se incluyó en la prueba la liraglutida con fines comparativos.

Los espectros de dicroísmo circular de UV-lejano se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-715 en péptido 5 μM (μM , micro-Molar) en Tris/ ClO_4 10 mM, pH 8,0. A los datos brutos se les restó el valor de fondo del tampón y se normalizaron a elipticidad molar en unidades de $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en base a la concentración de enlaces a péptidos y se extrajo el valor de intensidad a 222 nm.

La intensidad a 222 nm se usó como una medida del contenido alfa-helicoidal, es decir, la señal es proporcional al contenido alfa-helicoidal de manera que un valor de $-1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corresponde al 10 % de estructura alfa-helicoidal (Venyaminov y Yang 1996: "Determination of protein secondary structure" En Circular Dichroism and conformational analysis of biomolecules (Ed. Fasman GD, Plenum Press NY), pp. 69-108).

A partir de los espectros, se derivaron los valores para la elipticidad molar ($\Delta\epsilon$, o épsilon delta) y se estimó el contenido alfa-helicoidal correspondiente. Las características generales de los espectros de los derivados de GLP-1 en el intervalo de 200-250 nm se describen por dos bandas con mínimos a 206 nm y 222 nm respectivamente. Esto está de acuerdo con una estructura secundaria con un estiramiento alfa-helicoidal significativo.

El valor de épsilon delta a 222 nm para la liraglutida en una concentración de 5 μM fue inferior a -3,6, que corresponde a un contenido alfa-helicoidal de la liraglutida inferior al 36 %.

Los valores de épsilon delta a 222 nm para los compuestos de los Ejemplos 4, 5, 11 y 14 en una concentración de 5 μM estuvieron en el intervalo de -2,0 a -3,6, que corresponde a contenidos de alfa-hélice en el intervalo de 20-36 %.

Los valores de épsilon delta a 222 nm para los compuestos de los Ejemplos 3, 7, 8, 9, 12, 13, 21, 22 y 24 en una concentración de 5 μM estuvieron en el intervalo de -3,7 a -6,0, que corresponde a contenidos de alfa-hélice en el intervalo de 37-60 %.

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados del péptido-1 similar a glucagón y su uso farmacéutico

<130> 7668.204-WO

<160> 3

<170> PatentIn versión 3,5

ES 2 672 770 T3

<210> 1
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1) .. (31)
 <223> GLP-1(7-37) Humano
 10
 <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

 <210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Fórmula general I (análogos de GLP-1)
 20
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1) .. (35)
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1) .. (2)
 <223> Xaa7-Xaa8 es (L-histidina-Aib), (desamino-histidina-alanina), o (desamino-Aib)
 30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa9 es Glu, o un derivado de Glu
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa16 es Val, o Leu
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa18 es Ser, Lys, Cys, o Arg
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (14) .. (14)
 <223> Xaa20 es Leu, o Lys
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (17) .. (17)
 <223> Xaa23 es Gln, Glu, Lys, Cys, o Arg
 55
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (18) .. (18)
 <223> Xaa24 es Ala, o Asn
 60
 <220>

- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (19) .. (19)
 <223> Xaa25 es Ala, o Val
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa27 es Glu, Ala, o Leu
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (22) .. (22)
 <223> Xaa28 es Phe, o un derivado de Phe
- 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (24) .. (24)
 <223> Xaa30 es Ala, Glu, Lys, o Arg
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (25) .. (25)
 <223> Xaa31 es Trp, Cys, o Lys
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa33 es Val, Cys, o Lys
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (28) .. (28)
 <223> Xaa34 es Lys, Cys, Glu, Asn, Dap, o Arg
- 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (29).. (29)
 <223> Xaa35 es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente
- 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (30).. (30)
 <223> Xaa36 es Arg, Lys, o está ausente
- 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa37 es Gly, Aib, Cys, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente
- 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (32) .. (32)
 <223> Xaa38 es Lys, Glu, Arg, o está ausente
- 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (33) .. (33)
 <223> Xaa39 es Lys, Arg, o está ausente
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (34) .. (34)
 <223> Xaa40 es Arg, o está ausente
- 65 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

ES 2 672 770 T3

<222> (35) .. (35)
 <223> Xaa41 es Arg, o está ausente
 <400> 2

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Tyr Xaa Glu Glu
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa
 35

- 5 <210> 3
- <211> 35
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Fórmula general II (análogos de GLP-1)
- 15 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1) .. (35)
- <220>
- 20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (1) .. (1)
- <223> Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, N-alfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o
- 25 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (2) .. (2)
- <223> Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico,
- 30 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (12) .. (12)
- <223> Xaa18 es Ser, Lys o Arg
- 35 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (24) .. (24)
- <223> Xaa30 es Ala, Glu, Lys, o Arg
- 40 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (27) .. (27)
- <223> Xaa33 es Val, o Lys
- <220>
- 45 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (28) .. (28)
- <223> Xaa34 es Lys, Glu, Dap, o Arg
- <220>
- 50 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (29).. (29)
- <223> Xaa35 es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente
- <220>
- 55 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- <222> (30).. (30)
- <223> Xaa36 es Arg, Lys, o está ausente

ES 2 672 770 T3

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa37 es Gly, Aib, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (32) .. (32)
 <223> Xaa38 es Lys, Glu, Arg, o está ausente

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (33) .. (33)
 <223> Xaa39 es Lys, Arg, o está ausente

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (34) .. (34)
 <223> Xaa40 es Arg, o está ausente

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (35) .. (35)
 <223> Xaa41 es Arg, o está ausente

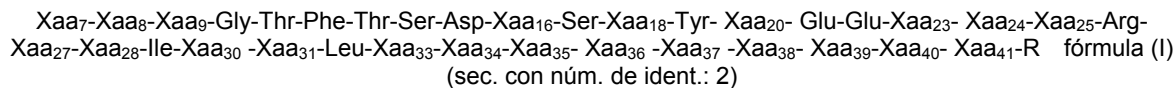
<400> 3

Xaa	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Xaa	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Arg	Glu	Phe	Ile	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa													
			35												

30

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1(7-37) modificada que tiene:
un total de 2-12 modificaciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1), que tiene la secuencia de la fórmula (I):



en donde

(Xaa₇ - Xaa₈) es (L-histidina-Aib), (desamino-histidina-alanina), o (desamino-histidina-Aib);

Xaa₉ es Glu;

Xaa₁₆ es Val, o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys, o Arg;

Xaa₂₀ es Leu, o Lys;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys, o Arg;

Xaa₂₄ es Ala, o Asn;

Xaa₂₅ es Ala, o Val;

Xaa₂₇ es Glu, Ala, o Leu;

Xaa₂₈ es Phe;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;

Xaa₃₁ es Trp, Cys, o Lys;

Xaa₃₃ es Val, Cys, o Lys;

Xaa₃₄ es Lys, Cys, Glu, Asn, Dap, o Arg;

Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente;

Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;

Xaa₃₇ es Gly, Aib, Cys, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;

Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;

Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;

Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;

Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y

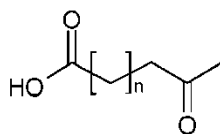
R es amida, o está ausente;

siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

y

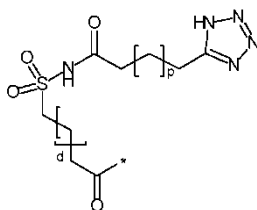
en donde el aminoácido en la posición equivalente a la posición 31 de GLP-1 (7-37) se deriva con A-B-C-D

en donde A- se selecciona del grupo que consiste en



(fórmula III)

y

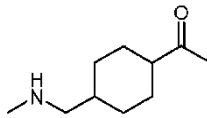


(fórmula IV),

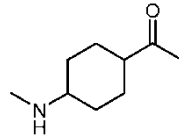
en donde el anillo tetrazol está N-sustituido opcionalmente, y

en donde n se selecciona del grupo que consiste en 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se selecciona del grupo que consiste en 10, 11, 12, 13 y 14, y d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

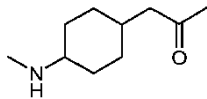
-B- se selecciona del grupo que consiste en



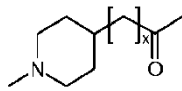
(fórmula IV).



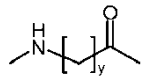
(fórmula VI).



(fórmula VII).



(fórmula VIII).

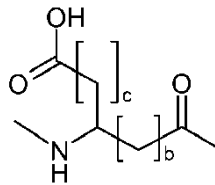


(fórmula IX).

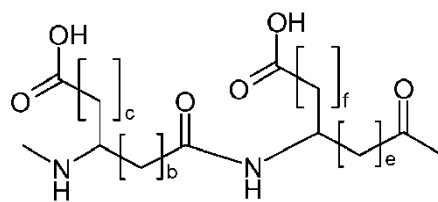
y

en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, e y se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

-C- se selecciona del grupo que consiste en

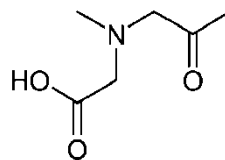


(fórmula X).



(fórmula XI).

y



(fórmula XII).

en donde b y e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2, y c y f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2 siempre y cuando b es 1 o 2 cuando c es 0, o b es 0 cuando c es 1 o 2, y e es 1 o 2 cuando f es 0, o e es 0 cuando f es 1 o 2, y

-D- se une a dicho residuo de aminoácido y es un conector, en donde dicho derivado de GLP-1 tiene una vida media de 40-100 horas después de la administración subcutánea en minicerdos.

- El derivado de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 1, que comprende sustituciones de 2-8 aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).

3. El derivado de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 1, que comprende deleciones de 1-3 aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
4. El derivado de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 1, que comprende 1-4 adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
5. El derivado de GLP-1 de conformidad con la reivindicación 1 que tiene una secuencia de fórmula (II):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- Xaa₃₆ -Xaa₃₇ -Xaa₃₈- Xaa₃₉- Xaa₄₀- Xaa₄₁-R fórmula (II) (sec. con núm. de ident.: 3)

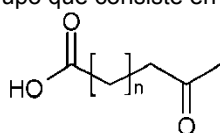
en donde

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;
 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, 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;
 Xaa₁₈ es Ser, Lys, o Arg;
 Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, o Arg;
 Xaa₃₁ es Lys, o Trp;
 Xaa₃₃ es Val, o Lys;
 Xaa₃₄ es Lys, Glu, Dap, o Arg;
 Xaa₃₅ es Gly, Arg, Lys, Aib, o está ausente;
 Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente;
 Xaa₃₇ es Gly, Aib, Lys, épsilon-amino-Lys, Pro, Arg, o está ausente;
 Xaa₃₈ es Lys, Glu, Arg, o está ausente;
 Xaa₃₉ es Lys, Arg, o está ausente;
 Xaa₄₀ es Arg, o está ausente;
 Xaa₄₁ es Arg, o está ausente; y
 R es amida, o está ausente;

siempre y cuando si Xaa₃₇, Xaa₃₈, Xaa₃₉, o Xaa₄₀ está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente;

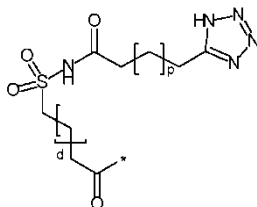
en donde el aminoácido en la posición equivalente a la posición 31 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se deriva con A-B-C-D

en donde A- se selecciona del grupo que consiste en



(fórmula III)

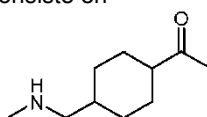
y



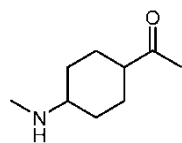
(fórmula IV).

en donde el anillo tetrazol está opcionalmente N-sustituido, y en donde n se selecciona del grupo que consiste en 14, 15, 16 17, 18 y 19, p se selecciona del grupo que consiste en 10, 11, 12, 13 y 14, y d se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

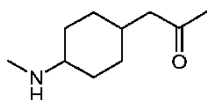
-B- se selecciona del grupo que consiste en



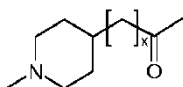
(fórmula V).



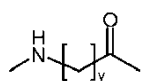
(fórmula VI).



(fórmula VII).



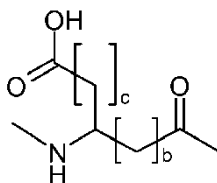
(fórmula VIII).



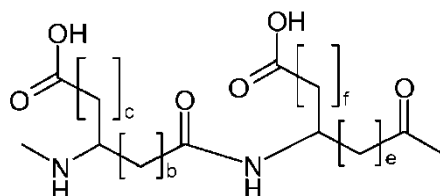
(fórmula IX).

en donde x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4, e y se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

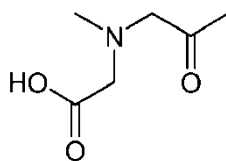
-C- se selecciona del grupo que consiste en



(fórmula X).



(fórmula XI).



(fórmula XII).

en donde b y e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2, y c y f se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en 0, 1 y 2 siempre y cuando b es 1 o 2 cuando c es 0, o b es 0 cuando c es 1 o 2, y e es 1 o 2 cuando f es 0, o e es 0 cuando f es 1 o 2, y

-D- se une a dicho residuo de aminoácido y es un conector.

6. El derivado de GLP de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 se selecciona de los siguientes:

N-épsilon31{2-[2-(2-{2-[2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxinonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil [Aib8, Glu22, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-37);

N-épsilon31-(2-{2-[2-(2-{2-[2-((S)-3-carboxi-3-[[1-(19-carboxi-nonadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]propionilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)[Aib8, Glu22, Arg26, Lys31, Arg34]GLP-1-(7-37);

N-épsilon31-[2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Glu22,Arg26,Lys31]GLP-1-(7-37);

5 N-épsilon31-[2-(2-[2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Arg34,Arg35,Arg37]GLP-1-(7-37);

10 N-épsilon31{2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil}-[Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Arg34,Arg35,Arg37]]GLP-1(7-37)il [Arg39,Arg40,Arg41];

10 N-épsilon31-[2-(2-[2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil][Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Lys35,Lys36]GLP-1-(7-36) amida; y

15 N-épsilon31-{2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil}-N-beta34-(2-(bis-carboximethylamino)acetil)[Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Dap34] GLP-1(7-34) amida.

7. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o su sal, amida, alquilo, o éster farmacéuticamente aceptable, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Un derivado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, para su uso como un medicamento.

9. Un derivado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

10. Uso de un derivado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.