

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 708**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/485 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2014 PCT/EP2014/072293**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055801**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2014 E 14795564 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3057984**

54 Título: **Análogos de glucagón acilados**

30 Prioridad:

17.10.2013 US 201361892256 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2018

73 Titular/es:

ZEALAND PHARMA A/S (50.0%)
Smedeland 36
2600 Glostrup, DK y
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

RIBER, DITTE;
TOLBORG, JAKOB LIND;
HAMPRECHT, DIETER WOLFGANG y
RIST, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 688 708 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de glucagón acilados

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos de glucagón acilados y a su uso médico, por ejemplo, en el tratamiento de la obesidad y el exceso de peso, la diabetes y otros trastornos metabólicos.

10 **Antecedentes de la invención**

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

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del proglucagón. La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia completa de 29 aminoácidos del glucagón con una extensión carboxiterminal octapeptídica (aminoácidos 82 a 89 del proglucagón y denominado "péptido interviniente 1" o IP-1. El fragmento biológicamente activo principal de GLP-1 se produce como un péptido amidado C-terminalmente de 30 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del proglucagón.

El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucosa en la sangre uniéndose a receptores de glucagón en los hepatocitos, provocando que el hígado libere glucosa almacenada en forma de glucógeno a través de la glucogenólisis. A medida que estos almacenes se agotan, el glucagón estimula el hígado para sintetizar glucosa adicional mediante la gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en el torrente sanguíneo, evitando el desarrollo de hipoglucemia.

El GLP 1 disminuye los niveles elevados de glucosa en sangre mediante la mejora de la secreción de insulina estimulada por glucosa y promueve la pérdida de peso principalmente a través de la disminución de la ingesta de alimentos.

La OXM se libera en la sangre en respuesta a la ingestión de alimentos y proporcionalmente al contenido calórico de la comida. Se ha demostrado que la OXM suprime el apetito e inhibe la ingesta de alimentos en seres humanos (Cohen et al., *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 88, 4696-4701, 2003, documento WO 2003/022304). Además de los efectos anorexígenos, que son similares a los del GLP-1, la OXM también debe afectar al peso corporal mediante otro mecanismo, puesto que las ratas tratadas con oxintomodulina muestran menos ganancia de peso corporal que las ratas alimentadas por parejas (Bloom, *Endocrinology* 2004, 145, 2687). El tratamiento de roedores obesos con OXM también mejora su tolerancia a la glucosa (Parlevliet et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E142-7, 2008) y suprime la ganancia de peso corporal (documento WO 2003/022304).

La OXM activa los receptores tanto del glucagón como del GLP-1 con una potencia dos veces mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1, pero es menos potente que el glucagón nativo y el GLP-1 sobre sus respectivos receptores. El glucagón humano también es capaz de activar ambos receptores, aunque con una fuerte preferencia por el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1. El GLP-1, por otro lado, no es capaz de activar los receptores de glucagón. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no se comprende bien. En particular, no se sabe si algunos de los efectos extrahepáticos de la hormona están mediados a través de los receptores de GLP-1 y glucagón o a través de uno o más receptores no identificados.

Se ha demostrado que otros péptidos se unen y activan el receptor tanto del glucagón como del GLP-1 (Hjort et al., *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30121-30124, 1994) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimentos (véase, ejemplo, el documento WO 2006/134340, el documento WO 2007/100535, el documento WO 2008/10101, el documento WO 2008/152403, el documento WO 2009/155257, el documento WO 2009/155258, el documento WO2010/070252, el documento WO2010/070253, el documento WO2010/070255, el documento WO2010/070251, el documento WO2011/006497, el documento WO2011/160630, el documento WO2011/160633, el documento WO2013/092703, el documento WO2014/041195).

La obesidad es un problema de salud creciente globalmente asociado a diversas enfermedades, en particular la enfermedad cardiovascular (ECV), la diabetes de tipo 2, la apnea obstructiva del sueño, ciertos tipos de cáncer y la osteoartritis. Como resultado, se ha descubierto que la obesidad reduce la esperanza de vida. De acuerdo con las proyecciones de 2005 de la Organización Mundial de la Salud, hay 400 millones de adultos (edad > 15) clasificados como obesos en todo el mundo. En los EE.UU., se cree que la obesidad es la segunda causa de muerte prevenible después del tabaquismo.

X20 se selecciona entre Lys y His;
X24 es Glu;
X28 es Ser.

5 Las combinaciones útiles de restos incluyen las siguientes:

X2 es Ac4c y X20 es Lys;
X2 es Aib y X20 es His.

10 Adicionalmente o como alternativa, puede ser deseable que X2 sea Aib si X15 es E o que X15 sea D si X2 es Ac4c.

Los sustituyentes particularmente interesantes Z^2Z^1 incluyen [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3 y [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG.

15 P^1 puede tener una secuencia seleccionada entre:

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD Ψ RAAKDFIEWLESA
H-Aib-QGTFTSDYSKYLD Ψ RAAKDFIEWLESA
20 H-Aib-QGTFTSDYSKYLE Ψ RAAKDFIEWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD Ψ RAAKDFIEWLESA y
H-Aib-QGTFTSDYSKYLE Ψ RAAHDFIEWLESA

por ejemplo, entre

25 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA y
30 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA y
H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA

El compuesto de la invención puede seleccionarse entre:

35 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD Ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD Ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE Ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD Ψ PRAAKDFIEWLESA-NH₂ y
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE Ψ RAAHDFIEWLESA-NH₂

40 por ejemplo, entre

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
45 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂ y
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-NH₂

En realizaciones alternativas:

50 X2 se selecciona entre Aib y Ac4c;
X3 se selecciona entre Gln y His;
X15 es Asp;
X16 es Glu;
X17 se selecciona entre Arg y Ψ ;
55 X18 se selecciona entre Ala y Arg;
X20 es Lys;
X24 se selecciona entre Glu y Ψ ;
X28 se selecciona entre Ser y Ψ ;

60 En algunas realizaciones, cuando X28 es Ψ , X2 es Ac4c.

En algunas realizaciones, cuando X3 es His, X2 es Ac4c y X17 es Ψ .

65 En algunas realizaciones, cuando X17 es Ψ , Z^2Z^1 es [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3 o [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu.

En algunas realizaciones, cuando X24 o X28 es Ψ , Z^2Z^1 es [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG.

P¹ puede tener una secuencia seleccionada entre:

5 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
 10 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE Ψ y
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE Ψ A

15 por ejemplo, entre

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA
 20 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
 25 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A y
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

El compuesto de la invención puede seleccionarse entre:

30 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA-NH₂
 35 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI Ψ WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE Ψ A-NH₂ y
 40 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE Ψ A-NH₂

por ejemplo, entre

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 45 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 50 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂ y
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

55 Para evitar dudas, aquellas posiciones que no se indican expresamente para permitir la variabilidad son fijas y, por tanto, solo pueden incluir el resto indicado.

El compuesto de la invención comprende un resto Ψ , es decir, un grupo seleccionado entre Lys, Arg, Orn y Cys en el que la cadena lateral está conjugada con un sustituyente $-Z^2-Z^1$ como se describe en más detalle a continuación.

60 El sustituyente está conjugado con el grupo funcional en el extremo distal de la cadena lateral del carbono alfa. La capacidad normal de la cadena lateral Lys, Arg, Orn o Cys para participar en interacciones mediadas por ese grupo funcional (por ejemplo, interacciones intra e intermoleculares) puede, por tanto, reducirse o eliminarse completamente por la presencia del sustituyente. Por tanto, las propiedades globales del compuesto pueden ser
 65 relativamente insensibles a los cambios en el aminoácido real como resto Ψ . En consecuencia, se cree que cualquiera de los restos Lys, Arg, Orn y Cys puede estar presente en cualquier posición donde Ψ esté permitido. Sin

embargo, en ciertas realizaciones, puede ser ventajoso que el componente aminoacídico Ψ sea Lys.

En algunas realizaciones, $-Z^1$ es un grupo acilo de fórmula:



un grupo sulfonilo de fórmula:



A es $-COOH$ o un bioisómero de ácido carboxílico;

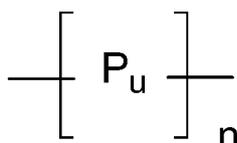
B es un enlace, arileno C_6 o arileno C_6-O- ;

15 Alc es una cadena grasa saturada o insaturada de 6 a 18 átomos de carbono de longitud, opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados entre flúor, alquilo C_{1-4} , trifluorometilo, hidroximetilo, amino, hidroxilo, alcoxi C_{1-4} , oxo y carboxilo;

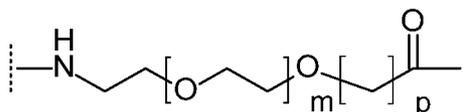
20 $-Z^2-$ es $-S_A-$, $-S_A-S_B-$ o $-S_B-S_A$;

$-S_A-$ es un resto aminoacídico individual seleccionado entre γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (ácido 3-aminopropanoico) y Gaba (ácido 4-aminobutanoico);

25 $-S_B-$ es un enlazador de fórmula general:



30 en la que n es 1-10 y cada P_u se selecciona independientemente entre P_U^i y P_U^{iii} ; cada P_U^i es independientemente un resto aminoacídico natural o no natural, y cada P_U^{iii} es independientemente un resto de fórmula general:



35 en la que m es 0-5 y p es 1, 3, 4 o 5.

En cualquier aspecto de la invención, R^1 puede seleccionarse entre H y alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo).

40 Los compuestos de la invención son péptidos análogos de glucagón. Las referencias en el presente documento a un péptido análogo de glucagón deben interpretarse como referencias a un compuesto de la invención o a un péptido P^1 o P^1-P^2 según lo requiera el contexto. La referencia a un compuesto de la invención debe tomarse como que incluye cualquier sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal de acetato o cloruro) o un solvato del mismo, a menos que se indique lo contrario o se excluya por el contexto.

45 La invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención como se define en el presente documento (incluyendo sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se ha descrito) en mezcla con un vehículo. En realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéutica y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El péptido análogo de glucagón puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable del análogo de glucagón.

50 Los compuestos que se describen en el presente documento encuentran un uso, entre otras cosas, para prevenir la ganancia de peso o para promover la pérdida de peso. "Prevenir" significa inhibir o reducir cuando se compara con la ausencia de tratamiento y no tiene por objeto necesariamente implicar el cese completo de la ganancia de peso. Los péptidos pueden provocar una disminución en la ingesta de alimentos y/o un mayor gasto de energía, dando como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal,

55 los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre el control de la glucosa y/o sobre los niveles de colesterol circulantes, siendo capaces de reducir los niveles circulantes de LDL y aumentar la relación HDL/LDL. Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse para la terapia directa o indirecta de cualquier afección provocada o caracterizada por el exceso de peso corporal, tal como el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, la obesidad mórbida, la inflamación vinculada a la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar vinculada

a la obesidad, la apnea del sueño inducida por obesidad. También pueden usarse para la prevención de afecciones provocadas o caracterizadas por un control inadecuado de la glucosa o dislipidemia (por ejemplo, niveles elevados de LDL o disminución de la relación HDL/LDL), diabetes (especialmente diabetes de tipo 2), síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular. Sus efectos en estas afecciones pueden ser resultado o asociarse a su efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

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

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

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

Por tanto, el compuesto de la invención puede usarse en combinación con un agente antidiabético que incluye, pero no se limita a, una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, una insulina o un análogo de insulina. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a Lantus™, Novorapid™, Humalog™, Novomix™, Actraphane HM™, Levemir™ y Apidra™.

El compuesto puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad que incluye, pero no se limita a, un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, péptido YY o análogo del mismo, antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina, antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación de inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona) o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

El compuesto puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antihipertensivo que incluye, pero no se limita a, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueante del receptor de angiotensina II, diurético, betabloqueante o bloqueante de canales de calcio.

El compuesto puede usarse en combinación con un agente antidislipidemia que incluye, pero no se limita a, una estatina, un fibrato, una niacina o un inhibidor de la absorción de colesterol.

Por tanto, la invención proporciona adicionalmente una composición o kit terapéutico que comprende un compuesto de la invención y, por ejemplo, un agente antidiabético, agente antiobesidad, agente antihipertensivo o agente antidislipidemia como se ha descrito anteriormente. También se proporciona una composición o kit terapéutico de este tipo para su uso en un método de tratamiento médico, especialmente para el tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

El compuesto de la invención puede fabricarse mediante química de síntesis. En consecuencia, la invención proporciona un método de síntesis de un compuesto de la invención.

La invención también puede fabricarse mediante una combinación de métodos recombinantes y de síntesis. El método puede comprender expresar una secuencia peptídica precursora, opcionalmente purificar el compuesto producido de este modo y añadir o modificar uno o más aminoácidos para producir un compuesto de la invención o un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos P¹ o P¹-P². La etapa de modificación puede comprender la introducción de un resto de Orn (por ejemplo, mediante la modificación de un resto precursor) y/o la introducción de un sustituyente ZZZ1 en el sitio de un resto Ψ.

El péptido precursor puede expresarse a partir de un ácido nucleico que codifica el péptido precursor en una célula o un sistema de expresión sin células que comprende dicho ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

En toda la presente memoria descriptiva, se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los aminoácidos naturales, así como abreviaturas generalmente aceptadas para otros aminoácidos, tales como Aib (ácido α-aminoisobutírico), Orn (ornitina), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico), Ac3c (ácido 1-amino-ciclopropanocarboxílico), Ac4c (ácido 1-amino-ciclobutanocarboxílico) y Ac5c (ácido 1-amino-ciclopentanocarboxílico).

Ac3c, Ac4c y Ac5c tienen estructuras similares y, en cierta medida, son intercambiables, aunque puede preferirse Ac4c.

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

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

Los aminoácidos dentro de la secuencia P¹ de los compuestos de la invención pueden considerarse numerados correlativamente de 1 a 29 en la dirección convencional N-terminal a C-terminal. La referencia a una "posición" dentro de P¹ ha de interpretarse en consecuencia, como ha de hacerse con la referencia a posiciones dentro del glucagón humano nativo y otras moléculas.

Un compuesto de la invención puede comprender una secuencia peptídica C-terminal P² de 1-20 aminoácidos, por ejemplo, para estabilizar la conformación y/o estructura secundaria del péptido análogo de glucagón, y/o para hacer que el péptido análogo de glucagón sea más resistente a la hidrólisis enzimática, por ejemplo, como se describe en el documento WO99/46283.

Cuando está presente, P² representa una secuencia peptídica de 1-20 restos aminoacídicos, por ejemplo, en el intervalo de 1-15, más preferentemente en el intervalo de 1-10, en particular en el intervalo de 1-7 restos aminoacídicos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos aminoacídicos, tales como 6 restos aminoacídicos. Cada uno de los restos aminoacídicos en la secuencia peptídica P² puede seleccionarse independientemente entre Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico) y Orn (ornitina). Preferentemente, los restos aminoacídicos se seleccionan entre Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn, más preferentemente se seleccionan exclusivamente entre Glu, Lys y Cys. Los aminoácidos mencionados anteriormente pueden tener cualquiera de las configuraciones de D o L, que, en ciertas realizaciones, tienen una configuración L. Son secuencias particularmente preferidas P² secuencias de cuatro, cinco, seis o siete restos de lisina consecutivos (es decir, Lys₃, Lys₄, Lys₅, Lys₆ o Lys₇) y en particular cinco o seis restos de lisina consecutivos. Otras secuencias de ejemplo de P² se muestran en el documento WO 01/04156. Como alternativa, el resto C-terminal de la secuencia P² puede ser un resto Cys. Esto puede ayudar a la modificación (por ejemplo, PEGilación o conjugación a albúmina) del compuesto. En dichas realizaciones, la secuencia P² puede tener, por ejemplo, un solo aminoácido de longitud (es decir, P² = Cys) o puede tener dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más aminoácidos de longitud. Por tanto, los otros aminoácidos sirven como un espaciador entre el péptido P¹ y el resto Cys terminal.

La secuencia peptídica P² tiene una identidad de secuencia de no más del 25 % con la secuencia correspondiente de la porción IP-1 de la OXM humana (que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

La "identidad de secuencia de aminoácidos en porcentaje (%)" de una secuencia peptídica o polipeptídica dada con respecto a otra secuencia polipeptídica (por ejemplo, IP-1) se calcula como el porcentaje de restos aminoacídicos en la secuencia peptídica dada que son idénticos a restos aminoacídicos posicionados correspondientemente en la secuencia correspondiente de ese otro polipéptido cuando los dos se alinean entre sí, introduciendo huecos para una alineación óptima si fuera necesario. Los valores de % de identidad puede determinarse usando WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: extensión de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Un valor de identidad de secuencia de aminoácidos en % se determina por el número de restos idénticos coincidentes según se determina por WU-BLAST-2, dividido por el número total de restos de la secuencia de referencia (ignorándose los huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para maximizar la puntuación de alineación), multiplicado por 100.

Por tanto, cuando P² se alinea óptimamente con los 8 aminoácidos ácidos de IP-1, tiene no más de dos aminoácidos que son idénticos a los aminoácidos correspondientes de IP-1.

En ciertas realizaciones, P² está ausente.

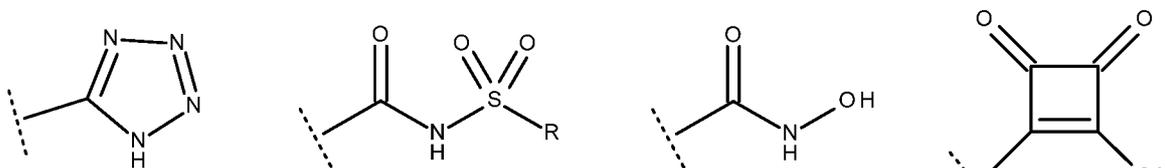
Ψ es un resto de Lys, Arg, Orn o Cys cuya cadena lateral está conjugada con un sustituyente Z²-Z¹. Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, se cree que el sustituyente se une a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina) en el torrente sanguíneo, protegiendo de este modo los compuestos de la invención de la degradación enzimática y potenciando de este modo la semivida de los compuestos. También puede modular la potencia del compuesto, por ejemplo, con respecto al receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1.

El grupo Z¹

Z¹ es una cadena grasa que tiene una conexión con Z², denominada en el presente documento -X- y, al final de la cadena distal de la conexión a Z², un grupo polar. -X- puede ser, por ejemplo, un enlace, acilo (-CO-), sulfinilo (-SO-) o sulfonilo (-SO₂-), estando localizada la conexión en la posición ω con respecto al grupo polar, es decir, al final de la cadena distal del grupo polar.

Preferentemente, el grupo polar es un grupo ácido o débilmente ácido, por ejemplo, un ácido carboxílico o un bioisómero de ácido carboxílico, un fosfonato o un sulfonato. El grupo polar puede tener un pK_a de entre -2 y 12 en agua, más preferentemente entre 1 y 7, más preferentemente entre 3 y 6. Ciertos grupos polares preferidos tienen un pK_a de entre 4 y 5.

El grupo polar preferentemente comprende un ácido carboxílico o bioisómero de ácido carboxílico. Se conocen en la técnica bioisómeros de ácido carboxílico adecuados. Preferentemente, el bioisómero tiene un protón que tiene un pK_a similar al ácido carboxílico correspondiente. Los ejemplos de bioisómeros adecuados pueden incluir, no a modo de limitación, tetrazol, acilsulfonamidas, acilhidroxilamina y derivados de ácido escuárico, como se muestra a continuación (--- indica el punto de unión):



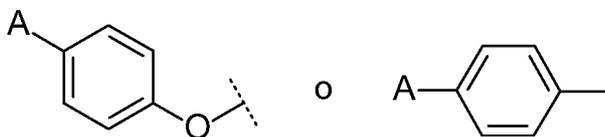
R es, por ejemplo, Me, CF₃

El grupo polar puede ser un grupo de fórmula A-B-, en la que A es un ácido carboxílico (-COOH) o un bioisómero de ácido carboxílico, un ácido fosfónico (-P(O)(OH)₂) o un grupo ácido sulfónico (-SO₂OH) y B es un enlace o enlazador entre A y la cadena grasa. En algunas realizaciones, el grupo polar es -COOH, es decir, A es -COOH y B es un enlace.

Cuando B es un enlazador, puede ser un cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno C₆ o heteroarileno C₅₋₆, o arileno C₆-O- o heteroarileno C₅₋₆-O-.

Cuando B es fenileno, puede seleccionarse, por ejemplo, entre 1,2-fenileno, 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, preferentemente 1,4-fenileno (de manera que A-B- es un sustituyente ácido 4-benzoico o bioisómero de ácido 4-benzoico). Cuando B es fenileno-O-, puede seleccionarse, por ejemplo, entre 1,2-fenileno-O-, 1,3-fenileno-O-, 1,4-fenileno-O-, preferentemente 1,4-fenileno-O-. Cada fenileno de B puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre flúor, metilo, trifluorometilo, amino, hidroxilo y alcoxi C₁₋₄, preferentemente metoxi. Se apreciará que la identidad y posición del sustituyente puede seleccionarse para alterar sutilmente el pK_a del grupo polar. En la técnica se conocen grupos donadores o aceptores inductiva o mesoméricamente adecuados y sus efectos posicionales. En algunas realizaciones, B puede ser heteroarileno C₅₋₆, por ejemplo, piridinileno o tiofuranileno, y puede estar opcionalmente sustituido como se describe.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, A-B- puede seleccionarse entre:



Preferentemente, A es -COOH. En algunos grupos polares preferidos, A es un ácido carboxílico y B es arileno C₆-O-.

La cadena grasa como se usa en el presente documento se refiere a un resto que comprende una cadena de átomos de carbono, estando los átomos de carbono predominantemente sustituidos con hidrógeno o átomos similares a hidrógeno, por ejemplo, una cadena hidrocarbonada. Dichas cadenas grasas con frecuencia se denominan lipófilas, aunque se apreciará que la sustitución puede alterar las propiedades lipófilas de la molécula global.

La cadena grasa puede ser alifática. Puede estar completamente saturado o puede incluir uno o más enlaces dobles o triples. Cada doble enlace, si está presente, puede estar en la configuración E o Z. La cadena grasa también puede tener uno o más restos cicloalquileo o heterocicloalquileo en su longitud y adicionalmente, o como alternativa, puede tener uno o más restos arileno o heteroarileno en su longitud. Por ejemplo, la cadena grasa puede

incorporar un resto fenileno o piperazinileno en su longitud, por ejemplo, como se muestra a continuación (en los que --- representa los puntos de unión dentro de la cadena).



5 La cadena grasa puede derivar de un ácido graso, por ejemplo, puede derivar de un ácido graso de cadena media (AGCM) con una cola alifática de 6-12 átomos de carbono, un ácido graso de cadena larga (AGCL) con una cola alifática de 13-21 átomos de carbono o un ácido graso de cadena muy larga (AGCL) con una cola alifática de 22 átomos de carbono o más. Los ejemplos de ácidos grasos saturados lineales de los que pueden derivar cadenas grasas adecuadas incluyen ácido tridecánico (tridecanoico), ácido mirístico (tetradecanoico), ácido pentadecílico (pentadecanoico), ácido palmítico (hexadecanoico) y ácido margálico (heptadecanoico). Los ejemplos de ácidos grasos insaturados lineales de los que pueden derivar cadenas grasas adecuadas incluyen ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico y ácido oleico.

15 La cadena grasa puede estar conectado a Z^2 mediante una unión amida, una unión sulfinamida, una unión sulfonamida o mediante una unión éster, o mediante una unión éter, tioéter o amina. En consecuencia, la cadena grasa puede tener en la posición ω , es decir, la posición distal al grupo polar, un enlace a Z^2 o un grupo acilo (-CO-), sulfinilo (-SO-) o sulfonilo (-SO₂-). Preferentemente, la cadena grasa tiene un grupo acilo (-CO-) en la posición distal al grupo polar y está conectado a Z^2 mediante una unión amida o éster.

20 En algunas realizaciones, Z^1 es un grupo de fórmula:



25 donde A-B- es el grupo polar definido anteriormente, X es un enlace, acilo (-CO-), sulfinilo (-SO-) o sulfonilo (-SO₂-), y Alc es una cadena grasa que puede estar opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes. La cadena grasa tiene preferentemente de 6 a 18 átomos de carbono de longitud (por ejemplo, un alquileo C₆₋₁₈), más preferentemente, de 8 a 18 átomos de carbono de longitud (por ejemplo, un alquileo C₈₋₁₈), más preferentemente, de 12 a 16 átomos de carbono de longitud (por ejemplo, alquileo C₁₂₋₁₆) y puede ser saturada o insaturada.

30 Preferentemente, Alc está saturado, es decir, preferentemente Alc es alquileo.

En algunas realizaciones, Z^1 es un grupo acilo de fórmula:



35 un grupo sulfonilo de fórmula:



40 Los sustituyentes opcionales en la cadena grasa pueden seleccionarse independientemente entre fluoro, alquilo C₁₋₄, preferentemente metilo; trifluorometilo, hidroximetilo, amino, hidroxilo, alcoxi C₁₋₄, preferentemente metoxi; oxo y carboxilo, y pueden localizarse independientemente en cualquier punto a lo largo de la cadena. En algunas realizaciones, cada sustituyente opcional se selecciona entre fluoro, metilo e hidroxilo. Cuando hay más de un sustituyente presente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, el número de

45 sustituyentes es de 0 a 3; más preferentemente, la cadena grasa está sin sustituir.

Preferentemente, Z^1 es un grupo acilo de fórmula:



50 Donde A y B son como se han definido anteriormente.

En algunas realizaciones, Z^1 es:
4-carboxifenoxinonanoíl HOOC-C₆H₄-O-(CH₂)₈-(CO)-.

55 Ciertos Z^1 preferidos derivan de ácidos α,ω -dicarboxílicos saturados de cadena larga de fórmula HOOC-(CH₂)₁₂₋₁₈-COOH, preferentemente, ácidos α,ω -dicarboxílicos saturados de cadena larga que tienen un número par de átomos de carbono en la cadena alifática. Por ejemplo, y no a modo de limitación, Z^1 puede ser:

60 13-carboxitridecanoíl HOOC-(CH₂)₁₂-(CO)-
15-carboxipentadecanoíl HOOC-(CH₂)₁₄-(CO)-; o
17-carboxiheptadecanoíl HOOC-(CH₂)₁₆-(CO)-.

El grupo ácido carboxílico puede reemplazarse por un bioisótero como se detalla en el presente documento.

El grupo Z²

- 5 Z² es un espaciador que conecta Z¹ con la cadena lateral del componente aminoácido de Ψ. En su forma más general, Z² es un espaciador unido a un extremo por Y, que pueden ser un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, y al otro extremo por X, que puede ser un enlace o un acilo (-CO-), sulfinilo (-SO-) o sulfonilo (-SO₂-). En consecuencia, Z² puede ser un espaciador de fórmula (--- indica puntos de unión):



en la que:

- 15 Y puede ser -NH-, -NR-, -S u -O, donde R puede ser alquilo, un grupo protector o puede formar una unión con otra parte del espaciador, formando la valencia restante una unión con Z¹;

X puede ser un enlace, CO-, SO- o SO₂-, formando la valencia restante una unión con la cadena lateral del componente aminoácido de Ψ;

- 20 V es un resto orgánico bivalente que une Y y X;

y n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Cuando n es 2 o más, cada Y, V y X es independiente de todos los demás Y, V y X.

- 25 En consecuencia, Z² puede estar unido a cada lado por uniones amida, sulfinamida, sulfonamida o éster, o mediante uniones amino, éter o tioéter, dependiendo de la naturaleza de Y y X y los grupos de unión correspondientes en Z¹ y la cadena lateral. Preferentemente, cuando Y es -S, X es un enlace. Cuando n es 2 o mayor, cada V también puede estar unido a cada V adyacente mediante uniones como se han descrito. Preferentemente, las uniones son amidas, ésteres o sulfonamidas, mucho más preferentemente amidas. En consecuencia, en algunas realizaciones, cada Y es -NH o -NR y cada X es CO- o SO₂-.

- 30 En algunas realizaciones, Z² es un espaciador de fórmula -S_A-, -S_B-, -S_A-S_B- o -S_B-S_A, en las que S_A y S_B son como se definen a continuación.

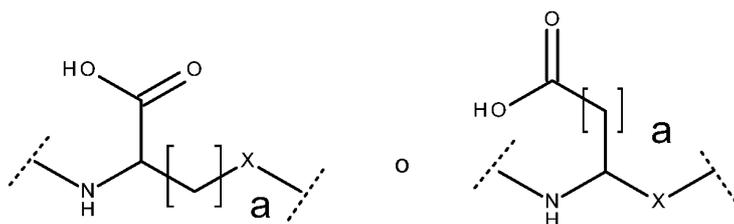
- 35 En algunas realizaciones, Z² se selecciona entre -S_A- o -S_B-S_A, es decir, [cadena lateral]-Z²Z¹ es [cadena lateral]-S_A-Z¹ o [cadena lateral]-S_B-S_A-Z¹.

El grupo S_A

- 40 S_A puede ser un resto aminoácido individual o un resto de un derivado de aminoácido, especialmente un resto de derivado de aminoácido que tiene un sulfinilo o sulfonilo en lugar del resto carboxi en el extremo C. Adicionalmente o como alternativa, el resto aminoácido individual puede tener un átomo de oxígeno o azufre en lugar del átomo de nitrógeno en el extremo N. Preferentemente, S_A es un resto aminoácido individual.

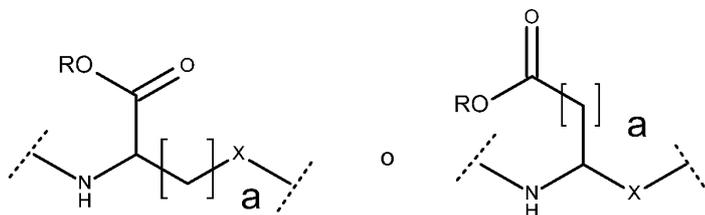
- 45 En algunas realizaciones, el aminoácido puede seleccionarse entre γ-Glu, α-Glu, α-Asp, β-Asp, Ala, β-Ala (ácido 3-amino-propanoico) y Gaba (ácido 4-aminobutanoico). Se entenderá que los aminoácidos pueden ser D o L, o una mezcla racémica o enriquecida enantioméricamente. En algunas realizaciones, el aminoácido es un L-aminoácido. En algunas realizaciones, el aminoácido es un D-aminoácido.

- 50 En algunas realizaciones preferidas, S_A tiene un sustituyente ácido carboxílico, prefiriéndose γ-Glu, α-Glu, α-Asp y β-Asp, y derivados de sulfinilo y sulfonilo de los mismos. En consecuencia, en algunas realizaciones, el resto aminoácido es:



55

donde -X- es -CO-, -SO-, -SO₂-, preferentemente -CO-, y a es 1 o 2, preferentemente 2. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico es un éster y el resto aminoacídico es:

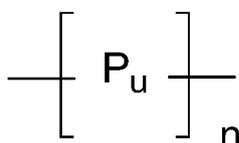


5 donde -X- es -CO-, -SO-, -SO₂-, preferentemente -CO-, y a es 1 o 2, preferentemente 2, y R es alquilo C₁₋₄ o arilo C₆. Preferentemente, R es alquilo C₁₋₄, preferentemente metilo o etilo, más preferentemente etilo.

Preferentemente, S_A es γ-Glu.

10 El grupo S_B

S_B puede ser un enlazador de fórmula general:



15 en la que Pu es una unidad polimérica y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Un término del enlazador S_B es un -NH-, -NR-, -S u -O-, en los que R puede ser alquilo, un grupo protector o puede formar una unión con otra parte de la unidad polimérica; mientras que el otro es un enlace o CO-, SO- o SO₂-. En consecuencia, cada unidad polimérica Pu
20 puede estar unida a cada lado por uniones amida, sulfinamida, sulfonamida o éster, o por uniones amino, éter o tioéter dependiendo de la naturaleza de Y y X y los grupos de unión correspondientes en Z¹, S_A y Lys.

En algunas realizaciones, cada Pu puede ser independientemente una unidad de fórmula:



en la que:

30 Y puede ser -NH-, -NR-, -S o -O-, en los que R puede ser alquilo, un grupo protector o puede formar una unión con otra parte del espaciador, formando la valencia restante una unión con Z¹;

X puede ser un enlace, CO-, SO- o SO₂-, formando la valencia restante una unión con Lys;

35 y V es un resto orgánico bivalente que une Y y X.

En algunas realizaciones, V es el carbono α de un aminoácido natural o no natural, es decir, V es -CHR^{AA}-, en el que R^A es una cadena lateral aminoacídica; o V es un alquileno C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o V es una cadena que comprende una o más unidades de etilenglicol en serie, también conocida como cadena de PEG, por ejemplo, -CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)_m-O-(CH₂)_p-, donde m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y p es 1, 2, 3, 4 o 5; cuando X es CO-, p es preferentemente 1, 3, 4 o 5. Los sustituyentes alquileno opcionales incluyen flúor, metilo, hidroxilo, hidroximetilo y amino.

Las unidades Pu preferidas incluyen:

45 (i). Restos aminoacídicos individuales: Puⁱ;

(ii). Restos dipeptídicos: Puⁱⁱ; y

50 (iii). Restos de ácido amino-(PEG)_m-carboxílico: Puⁱⁱⁱ,

y pueden estar presentes en cualquier combinación u orden. Por ejemplo, S_B puede comprender uno o más de cada uno de Puⁱ, Puⁱⁱ y Puⁱⁱⁱ en cualquier orden, o puede comprender una o más unidades de Puⁱ, Puⁱⁱ y Puⁱⁱⁱ solamente, o una de más unidades seleccionadas entre Puⁱ y Puⁱⁱ, Puⁱ y Puⁱⁱⁱ o Puⁱⁱ y Puⁱⁱⁱ.

(i). Restos aminoacídicos individuales Pu^i

5 Cada Pu^i puede seleccionarse independientemente entre cualquier resto aminoacídico natural o no natural y, por ejemplo, puede seleccionarse entre Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, α -Glu, γ -Glu, Asp, Ser, Thr, Gaba, Aib, β -Ala, 5-aminopentanoilo, 6-aminohexanoilo, 7-aminoheptanoilo, 8-aminooctanoilo, 9-aminononanoilo y 10-aminodecanoilo. Preferentemente, los restos aminoacídicos individuales se seleccionan entre Gly, Ser, Ala, Thr y Cys, más preferentemente entre Gly y Ser.

10 En algunas realizaciones, S_B es $-(Pu^i)_n-$, en el que n es de 1 a 8, más preferentemente de 5 a 7, mucho más preferentemente 6. En algunas realizaciones preferidas, S_B es $-(Pu^i)_n-$, n es 6 y cada Pu^i se selecciona independientemente entre Gly o Ser, siendo una secuencia preferida -Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly-.

(ii). Restos dipeptídicos Pu^{ii}

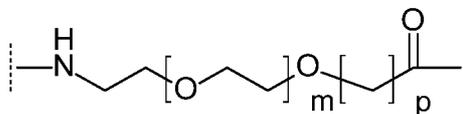
15 Cada Pu^{ii} puede seleccionarse independientemente entre cualquier resto dipeptídico que comprenda dos restos aminoacídicos naturales o no naturales unidos mediante un enlace amida. Los restos dipeptídicos Pu^{ii} preferidos incluyen Gly-Gly, Gly-Ser, Ser-Gly, Gly-Ala, Ala-Gly y Ala-Ala, más preferentemente Gly-Ser y Gly-Gly.

20 En algunas realizaciones, S_B es $-(Pu^{ii})_n-$, en el que n es de 2 a 4, más preferentemente 3 y cada Pu^{ii} se selecciona independientemente entre Gly-Ser y Gly-Gly. En algunas realizaciones preferidas S_B es $(Pu^{ii})_n-$, n es 3 y cada Pu^{ii} se selecciona independientemente entre Gly-Ser y Gly-Gly, siendo una secuencia preferida $-(Gly-Ser)-(Gly-Ser)-(Gly-Gly)$.

25 Los aminoácidos que tienen centros estereogénicos dentro de Pu^i y Pu^{ii} pueden ser racémicos, enriquecidos enantioméricamente o enantioméricamente puros. En algunas realizaciones, el o cada aminoácido es independientemente un L-aminoácido. En algunas realizaciones, el o cada aminoácido es independientemente un D-aminoácido.

(iii). Restos de ácido amino-(PEG)m-carboxílico Pu^{iii}

30 Cada Pu^{iii} puede ser independientemente un resto de fórmula general:



35 en la que m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, preferentemente 1 o 2 y p es 1, 3, 4 o 5, preferentemente 1.

40 En algunas realizaciones, m es 1 y p es 1, es decir, Pu^{iii} es un resto de ácido 8-amino-3,6-dioxactanoico (también conocido como ácido {2-[2-aminoetoxi]etoxi}acético y H_2N-PEG_3-COOH). Este resto se denomina en el presente documento -PEG₃-.

45 En algunas realizaciones, m es 2 y p es 1, es decir, Pu^{iii} es un resto de ácido 11-amino-3,6,9-trioxaundecanoico (también conocido como H_2N-PEG_4-COOH). Este resto se denomina en el presente documento -PEG₄-.

En algunas realizaciones, S_B es $-(Pu^{iii})_n-$, en el que n es de 1 a 3, más preferentemente 2.

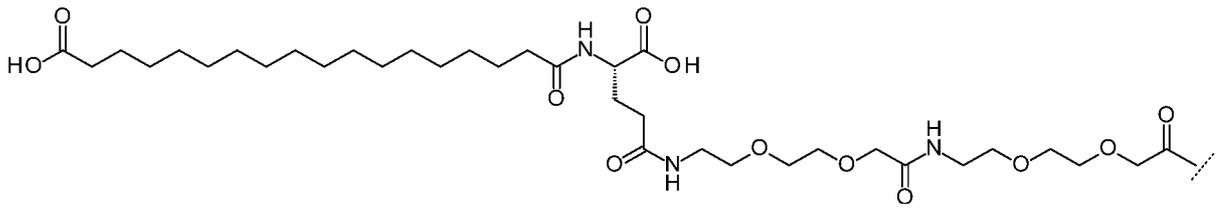
En algunas realizaciones preferidas, S_B se selecciona entre -PEG₃-PEG₃- y -PEG₄-PEG₄-.

-Z²-Z¹ preferido'

50 Se entenderá que las preferencias anteriores pueden combinarse independientemente para proporcionar combinaciones preferidas de -Z²-Z¹.

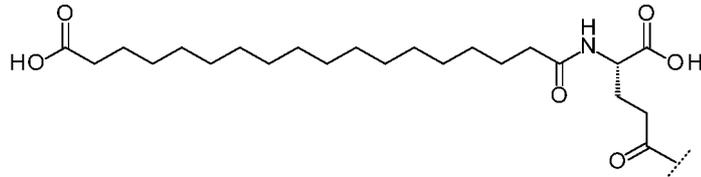
Algunas combinaciones preferidas de -Z²-Z¹ se muestran a continuación (en cada caso, --- indica el punto de unión a la cadena lateral del componente aminoacídico de Ψ):

55 (i) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3



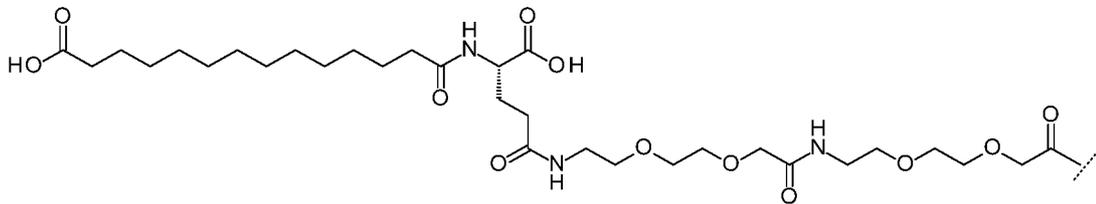
(ii) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu

5

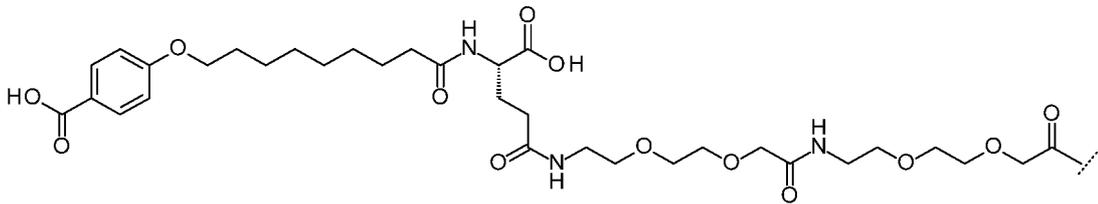


(iii) [13-Carboxi-tridecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3

10

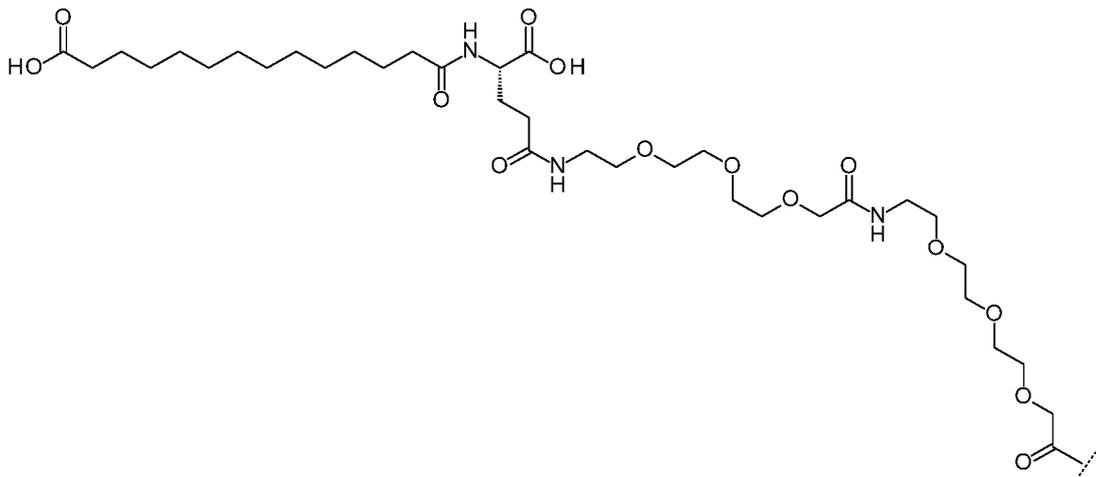


(iv) [Carboxifenoxnonanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3



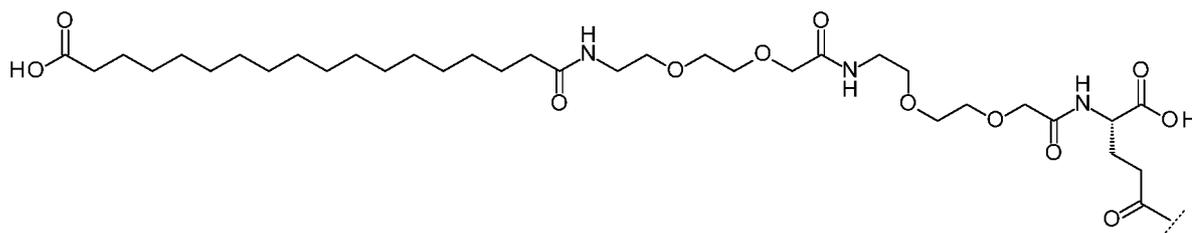
15

(v) [13-Carboxi-tridecanoil]-isoGlu-Peg4-Peg4

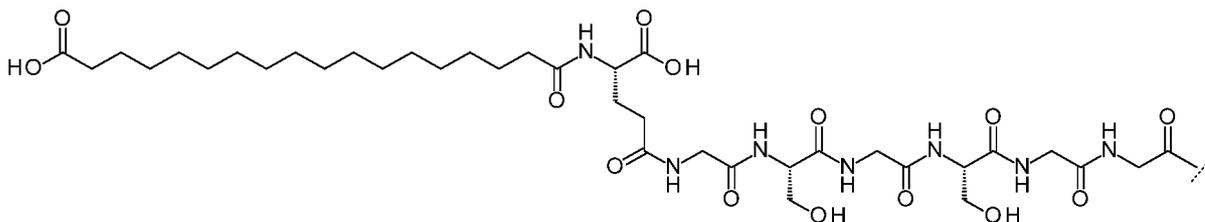


20

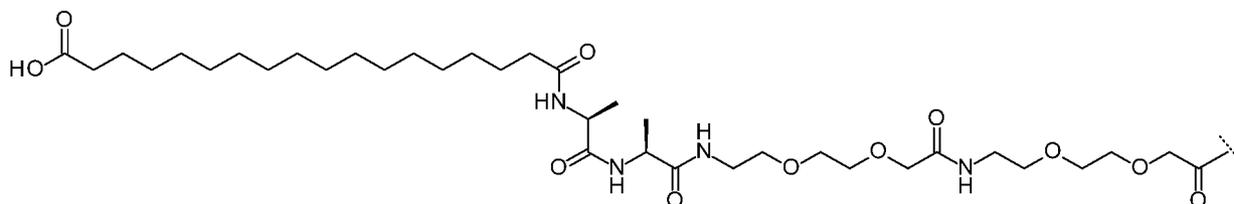
(vi) [17-Carboxi-heptadecanoil]-Peg3-Peg3-isoGlu



(vii) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG



(viii) [17-carboxi-heptadecanoil]-AA-Peg3-Peg3



Se cree que la presencia del grupo polar en el extremo de Z¹ potencia las propiedades farmacocinéticas del compuesto, por ejemplo, mediante el aumento de la semivida y/o el tiempo de residencia medio y la disminución del aclaramiento. El enlazador también puede contribuir a estas propiedades farmacocinéticas. Los enlazadores que comprenden más de una unidad aminoacídica (o restos de tamaño similar) pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas en comparación con los que consisten en una sola unidad aminoacídica o similar. Estas propiedades pueden permitir que el compuesto se administre con menos frecuencia que un compuesto equivalente con la misma estructura principal peptídica, pero sin modificación o una modificación diferente (por ejemplo, un sustituyente con una cadena grasa alifática que carece de un grupo polar y/o que tiene un resto enlazador más corto).

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, los inventores han descubierto que, especialmente cuando se incluyeron enlazadores más largos, el grupo polar o cargado en el extremo de Z¹ puede ser capaz de participar en una interacción intramolecular indeseable con el extremo N libre de la molécula que podría comprometer los efectos beneficiosos del grupo polar sobre la farmacocinética. Se cree que las cadenas principales peptídicas de los compuestos que se describen en el presente documento adoptan una estructura secundaria helicoidal relativamente bien definida, de manera que la capacidad del grupo polar para participar en dichas interacciones puede depender de su ubicación dentro de la molécula. Cuando se localiza hacia el extremo C, la interacción con el extremo N puede ser relativamente poco probable. Sin embargo, los inventores se sorprendieron al descubrir que el sustituyente podría localizarse en los restos 16 y 17 de la molécula sin comprometer necesariamente los beneficios farmacocinéticos obtenidos.

El término "conjugado" se usa en el presente documento para describir la unión física de un resto químico identificable a otro y la relación estructural entre dichos restos. No debe tomarse como que implica ningún método de síntesis particular.

El lector experto estará al tanto de técnicas adecuadas que pueden usarse para realizar las reacciones de acoplamiento usando metodologías de síntesis generales enumeradas, por ejemplo, en "*Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations*", 2ª edición, Larock, R. C.; Wiley-VCH: Nueva York, 1999. Dichas transformaciones pueden tener lugar en cualquier etapa adecuada durante el proceso de síntesis.

Síntesis peptídica

Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse ya sea mediante métodos de síntesis convencionales, sistemas de expresión recombinante o cualquier otro método del estado de la técnica. Por tanto, los análogos de glucagón pueden sintetizarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, un método que comprende:

(a) sintetizar el péptido por medio de una metodología en fase sólida o en fase líquida, ya sea por etapas o por ensamblaje de fragmentos, y aislamiento y purificación del producto peptídico final; o

5 (b) expresar una secuencia peptídica precursora a partir de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido precursor, recuperar el producto de expresión y modificar el péptido precursor para producir un compuesto de la invención.

La expresión se realiza normalmente a partir de un ácido nucleico que codifica el péptido precursor, que puede realizarse en una célula o en un sistema de expresión sin células que comprende un ácido nucleico de este tipo.

10 Se prefiere sintetizar los análogos de la invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. En este contexto, se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, a Fields, GB et al., 2002, "*Principles and practice of solid-phase peptide synthesis*". En: *Synthetic Peptides* (2da Edición) y los Ejemplos en el presente documento.

15 Para la expresión recombinante, los fragmentos de ácido nucleico que codifican el péptido precursor se insertarán normalmente en vectores adecuados para formar vectores de clonación o expresión. Los vectores pueden, dependiendo del propósito y tipo de aplicación, estar en forma de plásmidos, fagos, cósmidos, minicromosomas o virus, pero también el ADN desnudo que solo se expresa transitoriamente en ciertas células es un vector importante. 20 Los vectores de clonación y expresión preferidos (vectores plasmídicos) son capaces de replicación autónoma, permitiendo de ese modo números de copias altos para los propósitos de la expresión de alto nivel o la replicación de alto nivel para la clonación posterior.

25 En general, un vector de expresión comprende las siguientes características en la dirección 5'→3' y en unión operable: un promotor para impulsar la expresión del fragmento de ácido nucleico, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder que permite la secreción (a la fase extracelular o, cuando sea aplicable, en el periplasma), el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido precursor y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador. Pueden comprender características adicionales tales como marcadores seleccionables y orígenes de replicación. Cuando se trabaja con vectores de expresión en cepas 30 productoras o estirpes celulares, puede preferirse que el vector sea capaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora. El experto está muy familiarizado con los vectores adecuados y puede diseñar uno de acuerdo con sus requisitos específicos.

35 Los vectores de la invención se usan para transformar células hospedadoras para producir el péptido precursor. Dichas células transformadas pueden ser células cultivadas o estirpes celulares utilizadas para la propagación de los fragmentos de ácidos nucleicos y vectores, y/o usarse para la producción recombinante de los péptidos precursores.

40 Las células transformadas preferidas son microorganismos tales como bacterias [tales como la especie *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*), *Salmonella* o *Mycobacterium* (preferentemente no patógeno, por ejemplo, *M. bovis* BCG), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) y protozoos. Como alternativa, las células transformadas pueden derivar de un organismo multicelular, es decir, puede ser una célula fúngica, una célula de insecto, una célula de alga, una célula vegetal o una célula animal tal como una célula de mamífero. Para los propósitos de clonación y/o expresión optimizada, se prefiere que la célula transformada sea capaz de replicar el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el 45 fragmento nucleico pueden usarse para la preparación a pequeña escala o a gran escala de los péptidos de la invención.

50 Cuando se produce el péptido precursor por medio de células transformadas, es conveniente, aunque lejos de ser esencial, que el producto de expresión se secrete en el medio de cultivo.

Eficacia

55 La unión de los compuestos pertinentes a receptores de GLP-1 o glucagón (Glu) puede usarse como una indicación de la actividad agonista, pero, en general se prefiere usar un ensayo biológico que mida la señalización intracelular provocada por la unión del compuesto al receptor pertinente. Por ejemplo, la activación del receptor de glucagón por un agonista de glucagón estimulará la formación de AMP cíclico celular (AMPC). De forma similar, la activación del receptor de GLP-1 por un agonista de GLP-1 estimulará la formación de AMPC celular. Por tanto, la producción de AMPC en células adecuadas que expresan uno de estos dos receptores puede usarse para controlar la actividad del receptor pertinente. El uso de un par adecuado de tipos celulares, expresando cada uno un receptor, pero no el otro, 60 puede usarse, por tanto, para determinar la actividad agonista hacia ambos tipos de receptor.

65 El experto estará al tanto de formatos de ensayo adecuados y se proporcionan ejemplos a continuación. El receptor de GLP-1 y/o el receptor de glucagón pueden tener la secuencia de los receptores como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden emplear el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) que tiene el número de acceso principal GI: 4503947 y/o el receptor de péptido 1 similar a glucagón humano (GLP-1R) que tiene el número de acceso principal GI: 166795283. (en aquellos donde se hace referencia a las secuencias de las

proteínas precursoras, debe entenderse, por supuesto, que los ensayos pueden hacer uso de la proteína madura, que carece de la secuencia señal).

5 Los valores de CE_{50} pueden usarse como una medida numérica de la potencia agonista en un receptor dado. Un valor de CE_{50} es una medida de la concentración de un compuesto necesaria para conseguir la mitad de la actividad máxima de ese compuesto en un ensayo particular. De este modo, por ejemplo, puede considerarse que un compuesto que tiene una CE_{50} [GLP-1] más baja que la CE_{50} [GLP-1] de glucagón en un ensayo particular tiene una potencia agonista del receptor de GLP-1 mayor que el glucagón.

10 Los compuestos que se describen en la presente memoria descriptiva son normalmente agonistas duales de GluGLP-1, según se determina mediante la observación de que son capaces de estimular la formación de AMPc tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor puede medirse en ensayos independientes y después compararse entre sí.

15 Al comparar el valor de CE_{50} para el receptor de GLP-1 (CE_{50} [GLP-1-R]) con el valor de CE_{50} para el receptor de glucagón, (CE_{50} [Glucagón-R]) para un compuesto dado, la selectividad para GLP-1R relativa puede calcularse de la siguiente manera:

$$\text{Selectividad de CLP-1R relativa [compuesto]} = (CE_{50} \text{ [GLP-1R]}) / (CE_{50} \text{ [Glucagón-R]})$$

20 El término " CE_{50} " significa la mitad de la Concentración Eficaz, normalmente en un receptor particular, o en el nivel de un marcador particular para la función del receptor, y puede referirse a una actividad inhibidora o antagonista, dependiendo del contexto bioquímico específico.

25 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, la selectividad relativa para un compuesto puede permitir que su efecto sobre el GLP-1 o el receptor de glucagón se compare directamente con su efecto sobre el otro receptor. Por ejemplo, cuanto mayor es la selectividad relativa para GLP-1 de un compuesto, más eficaz puede ser ese compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón. Normalmente, los resultados se comparan para los receptores de glucagón y GLP-1 de la misma especie, por ejemplo, glucagón humano y receptores de GLP-1, o glucagón murino y receptores de GLP-1.

30 Los compuestos de la invención pueden tener una selectividad para GLP-1R relativa más alta que el glucagón humano porque en un nivel particular de actividad agonista de glucagón-R, el compuesto puede mostrar un nivel más alto de actividad agonista de GLP-1R (es decir, mayor potencia en el receptor de GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la potencia absoluta de un compuesto particular en los receptores de glucagón y de GLP-1 puede ser más alta, más baja o aproximadamente igual a la del glucagón humano nativo, siempre que se consiga la selectividad para GLP-1R relativa adecuada.

35 Sin embargo, los compuestos de la presente invención pueden tener una CE_{50} [GLP-1 R] más baja que el glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} [GLP-1R] más baja que el glucagón mientras mantienen una CE_{50} [Glucagón-R] que es menos de 10 veces más alta que la del glucagón humano, menos de 5 veces más alta que la del glucagón humano o menos de 2 veces más alta que la del glucagón humano.

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

45 La selectividad relativa para GLP-1R de los compuestos puede estar entre 0,05 y 20. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una selectividad relativa de 0,05-0,20, 0,1-0,30, 0,2-0,5, 0,3-0,7 o 0,5-1,0; 1,0-2,0, 1,5-3,0, 2,0-4,0 o 2,5-5,0; o 0,05-20, 0,075-15, 0,1-10, 0,15-5, 0,75-2,5 o 0,9-1,1.

50 En ciertas realizaciones, puede ser deseable que la CE_{50} de cualquier compuesto dado tanto para el Glucagón-R como para el GLP-1R, por ejemplo, para el glucagón humano y los receptores de GLP-1, sea inferior a 1 nM.

55 Usos terapéuticos

Los compuestos de la invención pueden proporcionar opciones atractivas de tratamiento y/o prevención para, entre otras cosas, la obesidad y enfermedades metabólicas incluyendo la diabetes, como se analiza a continuación.

60 La diabetes comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. Los signos agudos de la diabetes incluyen una producción excesiva de orina, dando como resultado sed compensatoria y un aumento de la ingesta de líquidos, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, letargo y cambios en el metabolismo energético. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a daño a largo plazo, disfunción y fallo de diversos órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. La diabetes se clasifica en diabetes de tipo 1, diabetes

de tipo 2 y diabetes gestacional sobre la base de las características patogénicas.

La diabetes de tipo 1 representa el 5-10 % de todos los casos de diabetes y es provocada por la destrucción autoinmune de células pancreáticas secretoras de insulina.

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

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

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

15 Una gran proporción de personas con diabetes de tipo 2 y prediabetes tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad debido a la alta prevalencia de factores de riesgo metabólicos adicionales, incluyendo obesidad abdominal (tejido adiposo excesivo alrededor de los órganos internos abdominales), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea incluyendo triglicéridos altos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, lo que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión) un estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno o inhibidor 1 del activador del plasminógeno altos en sangre) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en sangre).

20 Por el contrario, la obesidad conlleva un mayor riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes de tipo 2 y, por ejemplo, ciertos tipos de cáncer, apnea obstructiva del sueño y enfermedad de la vesícula biliar.

25 La dislipidemia se asocia a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. La lipoproteína de alta densidad (HDL) es de importancia clínica puesto que existe una correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de HDL y el riesgo de enfermedad aterosclerótica. La mayor parte del colesterol almacenado en las placas ateroscleróticas se origina en las LDL y, por tanto, las concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se asocian estrechamente a la aterosclerosis. La relación HDL/LDL es un indicador de riesgo clínico para la aterosclerosis y la aterosclerosis coronaria en particular.

30 El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona. Incluyen la obesidad abdominal (tejido adiposo excesivo alrededor de los órganos abdominales internos), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea incluyendo triglicéridos altos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, lo que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión), resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno o inhibidor 1 del activador del plasminógeno altos en la sangre) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en la sangre).

35 Las personas con el síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de enfermedad coronaria y otras enfermedades relacionadas con otras manifestaciones de arterioesclerosis (por ejemplo, ictus y enfermedad vascular periférica). El factor de riesgo subyacente dominante para este síndrome parece ser la obesidad abdominal.

40 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, se cree que los compuestos de la invención actúan como agonistas duales tanto sobre el receptor de glucagón humano como sobre el receptor de GLP1 humano, abreviado en el presente documento como agonistas de GluGLP-1 duales. El agonista dual puede combinar el efecto del glucagón, por ejemplo, sobre el metabolismo de las grasas, con el efecto del GLP-1, por ejemplo, sobre los niveles de glucosa en sangre y la ingesta de alimentos. Por tanto, pueden actuar para acelerar la eliminación del tejido adiposo excesivo, inducir una pérdida de peso sostenible y mejorar el control glucémico. Los agonistas duales de GluGLP-1 también pueden actuar para reducir los factores de riesgo cardiovasculares, tales como el colesterol alto, el colesterol LDL alto o las relaciones bajas de colesterol HDL/LDL.

45 Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse en un sujeto que los necesite como agentes farmacéuticos para prevenir el aumento de peso, promover la pérdida de peso, reducir el exceso de peso corporal o tratar la obesidad (por ejemplo, mediante el control del apetito, la alimentación, la ingesta de alimentos, la ingesta de calorías y/o el gasto energético), incluyendo la obesidad mórbida, así como las enfermedades y afecciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, la inflamación vinculada a la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar vinculada a la obesidad y la apnea del sueño inducida por la obesidad. Los compuestos de la invención también pueden usarse para el tratamiento de afecciones provocadas por o asociadas a un control alterado de la glucosa, incluyendo el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la prediabetes, la glucosa en ayunas elevada, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la aterosclerosis, la arterioesclerosis, la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica y el ictus, en un sujeto que lo necesite. Algunas de estas afecciones pueden asociarse a la obesidad. Sin embargo, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas afecciones pueden estar mediados total o parcialmente por un efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del

mismo.

5 El efecto sinérgico de los agonistas duales de GluGLP-1 también puede dar como resultado la disminución de factores de riesgo cardiovascular tales como el colesterol y el LDL altos, que pueden ser completamente independientes de su efecto sobre el peso corporal.

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

10 En un aspecto preferido, los compuestos que se describen pueden usarse en el tratamiento de la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2.

15 En una realización específica, los compuestos de la presente invención se proporcionan para su uso en el tratamiento de la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2 en un individuo que lo necesite.

Los compuestos que se describen pueden usarse adicionalmente para prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso.

20 Por tanto, los compuestos de la presente invención se proporcionan adicionalmente para su uso en la prevención del aumento de peso o la promoción de la pérdida de peso en un individuo que lo necesite.

25 Los compuestos de la presente invención se proporcionan adicionalmente para su uso en un método de tratamiento de una afección provocada o caracterizada por un exceso de peso corporal, por ejemplo, el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, la obesidad mórbida, la obesidad mórbida antes de la cirugía, la inflamación vinculada a la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar vinculada a la obesidad, la apnea del sueño inducida por la obesidad, la prediabetes, la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arterioesclerosis, la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica, el ictus o la enfermedad microvascular en un individuo que lo necesite.

30 Los compuestos de la presente invención se proporcionan adicionalmente para su uso en un método para disminuir los niveles de LDL circulantes y/o aumentar la relación HDL/LDL en un individuo que lo necesite.

35 Los compuestos que se describen pueden usarse en un método para disminuir los niveles circulantes de triglicéridos.

Composiciones farmacéuticas

40 Los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para el almacenamiento o la administración. Una composición de este tipo normalmente comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, en la forma apropiada, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, del tipo de mamífero que se trata y de las características físicas del mamífero específico que se considera. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos por los facultativos expertos en medicina. Esta cantidad y el método de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima y pueden depender de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores, bien conocidos por los expertos en medicina. Los tamaños de dosificación y la pauta de dosificación más apropiados para su uso humano pueden estar guiados por los resultados obtenidos mediante la presente invención y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados apropiadamente. Los compuestos de la presente invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de seres humanos.

50 Pueden determinarse una dosificación eficaz y un protocolo de tratamiento por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y después aumentando la dosificación mientras se controlan los efectos y también variando sistemáticamente la pauta de dosificación. Un médico puede tener en cuenta numerosos factores cuando determina una dosificación óptima para un sujeto dado. Dichas consideraciones son conocidas por el experto.

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

animales, incluyendo los seres humanos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de uno cualquiera de los compuestos de la invención. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Los ejemplos de sales básicas incluyen sales donde el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio y iones amonio $^+N(R^3)_3(R^4)$, donde R^3 y R^4 indican independientemente alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquenoilo C_{2-6} opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes y en la *Enciclopedia of Pharmaceutical Technology*.

"Tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización de la patología (es decir, que no empeore), el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la patología y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. En consecuencia, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas en ciertas realizaciones. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que ha de prevenirse el trastorno. Por tratamiento se entiende inhibir o reducir un aumento en la patología o los síntomas (por ejemplo, aumento de peso, hiperglucemia) cuando se compara con la ausencia de tratamiento y no significa necesariamente que implique el cese completo de la afección pertinente.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades individuales de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, sello o comprimido en sí mismo, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en forma inyectable de dosis única, por ejemplo, en forma de pluma. En ciertas realizaciones, las formas envasadas incluyen una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medios de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica y transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

Los modos de administración subcutáneos o transdérmicos pueden ser particularmente adecuados para los compuestos que se describen en el presente documento.

Las composiciones de la invención pueden combinarse adicionalmente o unirse, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo farmacológico, sistema de entrega de fármaco y sistema de entrega de fármaco avanzado para potenciar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir la cronoterapia bien conocida por los expertos en la materia y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, sistemas de entrega de fármacos y sistemas avanzados de entrega de fármacos incluyen, entre otras cosas, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas transportadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos por los expertos en la materia del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de los mismos y dendrímeros.

60 Terapia de combinación

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

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

Por tanto, un compuesto o composición de la invención puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad, incluyendo, pero no limitado a, un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, péptido YY o análogo del mismo, antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina, antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación de inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona) o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

Un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antihipertensivo, incluyendo, pero no limitado a, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueante del receptor de angiotensina II, diuréticos, betabloqueante o bloqueante de canales de calcio.

Un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antidislipidemia, incluyendo, pero no limitado a, una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.

Adicionalmente, un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antidiabético, incluyendo, pero no limitado a, una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un Inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista de GLP-1 diferente, una insulina o un análogo de insulina. En una realización preferida, el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina o un análogo de insulina, inhibidor de DPP-IV, sulfonilurea o metformina, en particular sulfonilurea o metformina, para conseguir un control glucémico adecuado. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix y Actraphane HM, Levemir y Apidra.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis general de análogos de glucagón

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) se realizó en un sintetizador asistido por microondas usando una estrategia convencional de Fmoc en NMP sobre una resina de poliestireno (TentaGel S Ram). Se usó HATU como reactivo de acoplamiento junto con DIPEA como base. Se usó piperidina (al 20 % en NMP) para la desprotección. Pseudoprolinas: se usaron Fmoc-Phe-Thr(ψMe,Mepro)-OH y Fmoc-Asp-Ser(ψMe,Mepro)-OH (adquiridos de NovaBiochem) cuando correspondía.

Las abreviaturas empleadas son como se indica a continuación:

Boc:	terc-butiloxicarbonilo
ivDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)3-metil-butilo
Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-etilo
DCM:	diclorometano
DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIPEA:	diisopropiletilamina
EDT:	1,2-etanoditiol
EtOH:	etanol
Et ₂ O:	dietil éter
HATU:	<i>N</i> -óxido de hexafluorofosfato <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridina-1-ilmetileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
MeCN:	acetonitrilo
NMP:	<i>N</i> -metilpirrolidona
TFA:	ácido trifluoroacético
TIS:	trisopropilsilano

Escisión:

El péptido en bruto se escindió de la resina por tratamiento con TFA/TIS/agua al 95/2,5/2,5 % (v/v) a temperatura ambiente (ta) durante 2 horas. La mayor parte del TFA se retiró a presión reducida y el péptido en bruto se precipitó y se lavó con dietiléter y se dejó secar hasta peso constante a temperatura ambiente.

Se sintetizaron los siguientes compuestos:

- 1 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-carboxi-pentadecanoil]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH₂.
- 2 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 3 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- 4 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- 5 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 6 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂

- 7 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
 8 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-NH₂
 9 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 10 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 5 11 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 12 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 13 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 14 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 10 15 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
 16 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

(El compuesto 1 no es un compuesto de la invención).

- 15 También se sintetizó el análogo de GLP-1 acilado semaglutida y tiene la estructura: H-H-[2-metil-Ala]-EGTFTSDVSSYLEGQAA-K([17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-EFIWLVRGRG-OH.

Ejemplo 2: Ensayos de eficacia del receptor de glucagón y del receptor de GLP-1

- 20 El ADNc que codifica ya sea el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) (número de acceso principal P47871) o el receptor de péptido 1 similar al glucagón humano (GLP-1 R) (número de acceso principal P43220) se sintetizó y se clonó en un vector de expresión de mamífero que contenía un marcador de resistencia a zeocina.

- 25 Los vectores de expresión de mamíferos que codificaban el Glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el método del método Attractene. Se obtuvieron clones de expresión estable por selección con Zeocina (25 µg/ml) tras una dilución limitada de células resistentes a la presión de selección. Los clones que expresaban Glucagón-R y GLP-1-R se recogieron, se propagaron y sometieron a ensayo en los ensayos de eficacia de Glucagón-R y GLP-1-R como se describen a continuación. Se eligieron un clon que expresaba Glucagón-R y un clon que expresaba GLP-1-R para el realizar el perfil de los compuestos.

- 30 Se sembraron células CHO que expresaban el Glucagón-R humano o GLP-1-R humano 24 horas antes del ensayo a 30.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos en cultivo en 100 µl de medio de crecimiento. El día del análisis, el medio de crecimiento se retiró y las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón de ensayo (Krebs-Ringerbuffer - KRBH). El tampón se retiró y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en 10 µl de KRBH (KRBH + HEPES 10 mM, NaHCO₃ 5 mM, BSA al 0,1 % (V/V)) con IBMX
 35 0,1 mM en agua desionizada que contenía concentraciones crecientes de péptidos de ensayo. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de lisis (BSA al 0,1 % p/v, HEPES 5 mM, Tween-20 al 0,3 % v/v). Después de la lisis celular durante 10 minutos a temperatura ambiente, los lisados se transfirieron a placas de 384 pocillos y se añadieron 10 µl de mezcla de perla aceptora/donadora contenida en el kit de ensayo funcional de AMPc AlphaScreen™. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, el contenido de AMPc
 40 se determinó aplicando el kit de ensayo funcional de AMPc AlphaScreen™ de Perkin-Elmer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La CE₅₀ y las eficacias relativas en comparación con los compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se calcularon aplicando un ajuste de curva asistido por ordenador. La relación GLP-1/glucagón se calcula como se ha definido anteriormente. Véase la Tabla 1.

45

Tabla 1.

Compuesto	CE ₅₀ de hGCGR en CHO-K1 [nM]	CE ₅₀ de hGLP-1R en CHO-K1 [nM]	Relación GLP-1/ Glucagón
1	0,21 nM	0,38 nM	1,81
2	0,13 nM	1,76 nM	13,54
3	1,48 nM	0,70 nM	0,47
4	0,45 nM	0,70 nM	1,56
5	0,18 nM	0,83 nM	4,61
6	0,44 nM	1,43 nM	3,25
7	0,11 nM	0,97 nM	8,82
8	0,31 nM	0,80 nM	2,58
9	0,07 nM	0,97 nM	13,86
10	1,08 nM	0,41 nM	0,38
11	0,28 nM	0,56 nM	2,00
12	0,07 nM	0,48 nM	6,86
13	0,52 nM	0,33 nM	0,63
14	0,18 nM	0,60 nM	3,33

15	0,92 nM	0,61 nM	0,65
16	0,16 nM	0,53 nM	3,31

Ejemplo 3: Actividad agonista sobre el receptor de GLP-1 endógeno

5 Se determinó la actividad agonista de los compuestos de ensayo en receptores de GLP-1 endógenos usando una estirpe celular de insulinooma murino. El AMPc intracelular se usó como indicador de la activación del receptor.

10 Las células se cultivaron durante 24 horas a una densidad de 10.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos. Se retiró el medio y se añadieron 10 µl de tampón KRBH (NaCl 130 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM) que contenía compuesto de ensayo o GLP-1 (a concentraciones crecientes de 0,1 pM a 100 nM) o disolvente control (DMSO al 0,1 % (v/v)) a los pocillos durante 15 minutos a una temperatura de 26 °C.

El contenido de AMPc celular se mide usando el kit de ensayo funcional de AMPc AlphaScreen (Perkin Elmer). La medición se realizó usando Envision (PerkinElmer) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

15 Los resultados se convirtieron en concentraciones de AMPc usando una curva patrón de AMPc preparada en tampón KRBH que contenía DMSO al 0,1 % (v/v). Las curvas de AMPc resultantes se representaron gráficamente como concentraciones absolutas de AMPc (nM) sobre logaritmo (concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

20 Los parámetros calculados para describir tanto la potencia como la actividad agonista de cada compuesto de ensayo sobre los receptores de GLP-1 endógenos fueron:

pCE₅₀ (valor logarítmico negativo de CE₅₀, una concentración que da como resultado una elevación semimáxima de los niveles de AMPc, que refleja la potencia del compuesto de ensayo);

25 Control porcentual (% de CTL) (% de elevación de AMPc para cada concentración de compuesto de ensayo normalizada basándose en la respuesta máxima de AMPc inducida por GLP-1 (100 % de CTL)). Véase la Tabla 2.

Tabla 2.

Compuesto	CE₅₀ [nM]
1	0,60 nM
2	0,69 nM
3	0,15 nM
4	0,40 nM
5	0,65 nM
6	0,54 nM
7	0,47 nM
8	0,36 nM
9	0,84 nM
10	0,60 nM
11	0,72 nM
12	0,81 nM
13	0,37 nM
14	0,38 nM
15	0,25 nM
16	0,34 nM

Ejemplo 4: Actividad agonista sobre el receptor de glucagón endógeno

30 Se determinó la actividad agonista de los compuestos de ensayo sobre el receptor de glucagón endógeno midiendo su efecto sobre la velocidad de síntesis de glucógeno en hepatocitos de rata primarios. Tras la activación del receptor de glucagón, se espera una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno. La velocidad de síntesis de glucógeno se determinó contando la cantidad de glucosa marcada radiactivamente incorporada en las reservas celulares de glucógeno en un período de tiempo definido.

Se cultivaron hepatocitos de rata primarios a una densidad de 40.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 horas a 37 °C y CO al 25 %.

40 El medio se descartó y las células se lavaron con PBS. Después, se añadieron a los pocillos 180 µl de tampón a base de KRBH que contenía BSA al 0,1 % y glucosa a una concentración de 22,5 mM, seguido del compuesto de ensayo y D-[U-¹⁴C] glucosa 40 µCi/ml (20 µl cada uno). La incubación continuó durante 3 horas.

Al final del período de incubación, el tampón de incubación se aspiró y las células se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo antes de la lisis por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de NaOH 1 mol/l.

5 Los lisados celulares se transfirieron a placas de filtro de 96 pocillos y el glucógeno precipitó mediante la incubación de las placas de filtro durante 120 min a 4 °C, seguido del lavado de las placas de filtro 4 veces con etanol enfriado con hielo (al 70 %). Los precipitados resultantes se filtraron a sequedad y se determinó la cantidad de ¹⁴C-glucosa incorporada usando un contador de centelleo Topcount de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10 Los pocillos con controles de vehículo (DMSO al 0,1 % (v/v) en tampón KRBH) se incluyeron como referencia para la síntesis de glucógeno no inhibida (100 % de CTL). Se incluyeron pocillos sin D-[U¹⁴C] glucosa añadida como controles para la señal de fondo no específica (restados de todos los valores). Se usó péptido de glucagón endógeno como control positivo.

15 Todos los tratamientos se realizaron al menos por duplicado.

Los parámetros calculados para describir tanto la potencia como la actividad agonista de cada compuesto de ensayo en el receptor de glucagón endógeno son pCE₅₀ y % de CTL.

20 El % de CTL se determina calculando el porcentaje de RPM/pocillo en presencia del compuesto de ensayo en comparación con el RPM/pocillo del control de vehículo después de restar el RPM/pocillo de fondo:

$$[\text{RPM/pocillo(basal)} - \text{RPM/pocillo (muestra)}] * 100 / [\text{RPM/pocillo (basal)} - \text{RPM/pocillo (control)}]$$

25 Un activador del receptor de glucagón dará como resultado una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno y dará valores de % de CTL entre el 0 % de CTL (inhibición completa) y el 100 % de CTL (inhibición no observable).

Las curvas de actividad resultantes se representaron gráficamente como recuentos absolutos (unidad: rpm/muestra) sobre logaritmo (concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

30

La pCE₅₀ (valor logarítmico negativo de CE₅₀) refleja la potencia del compuesto de ensayo.

Tabla 3.

Compuesto	CE ₅₀ [nM]
1	0,85 nM
2	0,11 nM
3	0,94 nM
4	1,79 nM
5	0,21 nM
6	0,80 nM
7	0,34 nM
8	0,29 nM
9	0,11 nM
10	1,53 nM
11	0,95 nM
12	0,45 nM
13	0,43 nM
14	0,19 nM
15	3,63 nM
16	0,19 nM

35

Los términos CE₅₀ y pCE₅₀ citados en relación con la activación de GLP-1R igualmente podrían considerarse como CI₅₀ y pCI₅₀ en relación con la síntesis de glucógeno.

Ejemplo 5: Estimación de parámetros farmacocinéticos

40

Se determinaron los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de ensayo después de la administración intravenosa a ratas Han/Wistar. El análogo de GLP-1 acilado semaglutida también se sometió a ensayo con fines comparativos.

45

Se obtuvieron ratas machos Wistar de Charles River (Alemania) que pesaban aproximadamente de 180 a 210 g en el momento de la llegada a la instalación de ensayo. Las ratas se enjaularon en jaulas para ratas convencionales europeas de tipo IV con un ciclo de luz de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. Durante el estudio, las ratas se alojaron en jaulas convencionales para ratas de tipo III. Se administraron tanto la dieta Altromin 1324 (Altromin, Alemania) como agua a demanda durante todo el período experimental. Los animales se alojaron en la instalación de ensayo durante al menos 4 días para garantizar una aclimatación adecuada.

Los compuestos se disolvieron en primer lugar en amoníaco acuoso al 0,1 % hasta una concentración nominal de 2 mg/ml y después se diluyeron hasta la concentración de dosificación deseada (10 μ M) en PBS estéril que contenía tampón de fosfato 25 mM, pH 7,4. Las inyecciones intravenosas correspondientes a 20 nmol/kg se administraron a través de una vena lateral de la cola.

Se recogieron muestras de sangre (200 μ l) del plexo periorbital en los puntos temporales 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 y 48 h después de la dosificación en tubos de K₃EDTA y se centrifugaron durante 5 minutos a 4 °C a los 20 minutos del muestreo. Las muestras de plasma (> 100 μ l) se transfirieron a placas PCR de 96 pocillos, se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -20 °C hasta que se analizaron las concentraciones plasmáticas para el compuesto de GLP-1-glucagón respectivo usando CL-EM/EM. Los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un enfoque no compartimental usando ToxKin™ versión 3.2 (Unilog IT Services) y se determinaron los parámetros farmacocinéticos resultantes. Véase la Tabla 4.

Tabla 4.

compuesto	Aclaramiento (ml/min/kg)	Semivida terminal (h)	Tiempo de residencia promedio (h)
2	0,11	9,1	13,6
3	0,056	23,4	28,7
4	0,11	13,7	17,6
Semaglutida	0,10	9,0	11,4

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que

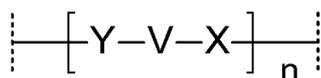
10 R^1 es H, alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo;
 R^2 es OH o NH_2 ;
 P^1 es un péptido que tiene la secuencia:

His-X2-X3-GTFTSDYSKYL-X15-X16-X17-X18-A-X20-DFI-X24-WLE-X28-A

15 en la que:

X2 se selecciona entre Aib, Ac3c, Ac4c y Ac5c;
 X3 se selecciona entre Gln y His;
 X15 se selecciona entre Asp y Glu;
 X16 se selecciona entre Glu y Ψ ;
 X17 se selecciona entre Arg y Ψ ;
 X18 se selecciona entre Ala y Arg;
 X20 se selecciona entre Lys y His;
 X24 se selecciona entre Glu y Ψ ;
 X28 se selecciona entre Ser y Ψ ;

y P^2 está ausente o es una secuencia de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn;
 en donde el compuesto contiene uno y solamente un Ψ
 y en donde dicho Ψ es un resto de Lys, Arg, Orn o Cys en el que la cadena lateral está conjugada con un sustituyente que tiene la fórmula $-Z^2Z^1$;
 $-Z^1$ es una cadena grasa que tiene un grupo polar en un extremo de la cadena y una conexión a Z^2 , -X- en el extremo de la cadena distal del grupo polar,
 en donde el grupo polar comprende un ácido carboxílico o un bioisómero de ácido carboxílico, un ácido fosfónico o un grupo de ácido sulfónico;
 y -X- es un enlace, -CO-, -SO- o -SO₂-;
 $-Z^2-$ es un espaciador de fórmula:



40 en la que:

45 cada Y es independientemente -NH-, -NR-, -S u -O, donde R es alquilo, un grupo protector o forma una unión a otra parte del espaciador Z^2 ;
 cada X es independientemente un enlace, CO-, SO- o SO₂-;
 a condición de que cuando Y es -S, X es un enlace;
 cada V es independientemente un resto orgánico bivalente que une Y y X;
 y n es 1-10;
 una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

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

X2 es Ac4c y X20 es Lys;
 X2 es Aib y X20 es His.

55 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que
 X2 es Aib si X15 es E; o
 X15 es D si X2 es Ac4c.

60 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que:

X2 se selecciona entre Aib y Ac4c;
 X3 se selecciona entre Gln y His;
 X15 es Asp;

X16 es Glu;
 X17 se selecciona entre Arg y Ψ;
 X18 se selecciona entre Ala y Arg;
 X20 es Lys;
 X24 se selecciona entre Glu y Ψ;
 X28 se selecciona entre Ser y Ψ;

5

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que P¹ tiene una secuencia seleccionada entre:

10 H-Aib-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
 H-Aib-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
 H-Aib-QGFTSDYSKYLEΨRAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
 H-Aib-QGFTSDYSKYLEΨRAAHDFIEWLESA
 15 H-Aib-QGFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 20 H-Aib-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEΨA y
 H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA

25

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 que se selecciona entre:

H-H-Aib-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Aib-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH2
 30 H-H-Aib-QGFTSDYSKYLEΨRAAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Aib-QGFTSDYSKYLEΨRAAHDFIEWLESA-NH2
 H-H-Aib-QGFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH2
 35 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH2
 H-H-Aib-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA-NH2
 40 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA-NH2
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEΨA-NH2 y
 H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA-NH2

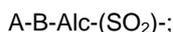
45

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que -Z¹ es un grupo acilo de fórmula:



un grupo sulfonilo de fórmula:

50



A es -COOH o un bioisómero de ácido carboxílico;

B es un enlace, arileno C₆ o arileno C₆-O-;

55

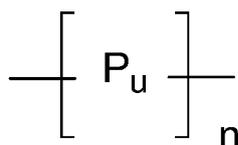
Alc es una cadena grasa saturada o insaturada de 6 a 18 átomos de carbono de longitud, opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados entre flúor, alquilo C₁₋₄, trifluorometilo, hidroximetilo, amino, hidroxilo, alcoxi C₁₋₄, oxo y carboxilo;

-Z²- es -S_A-, -S_A-S_B- o -S_B-S_A;

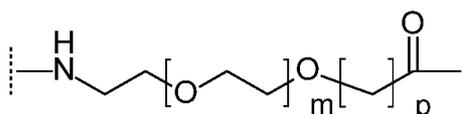
-S_A- es un único resto aminoacídico seleccionado entre γ-Glu, α-Glu, α-Asp, β-Asp, Ala, β-Ala (ácido 3-aminopropanoico) y Gaba (ácido 4-aminobutanoico);

60

-S_B- es un enlazador de fórmula general:



en la que n es 1-10 y cada Pu se selecciona independientemente entre Puⁱ y Puⁱⁱⁱ;
 cada Puⁱ es independientemente un resto aminoacídico natural o no natural; y
 cada Puⁱⁱⁱ es independientemente un resto de fórmula general:



en la que m es 0-5 y p es 1, 3, 4 o 5.

8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que Z¹-Z² se selecciona entre:

- (i) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (ii) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu
- (iii) [13-Carboxi-tridecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (iv) [Carboxifenoxinonanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (v) [13-Carboxi-tridecanoil]-isoGlu-Peg4-Peg4;
- (vi) [17-Carboxi-heptadecanoil]-Peg3-Peg3-isoGlu;
- (vii) [17-Carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG; y
- (viii) [17-Carboxi-heptadecanoil]-AA-Peg3-Peg3.

9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Z²-Z¹ es [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3 o [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 en el que, cuando X₂₄ o X₂₈ es Ψ, Z²Z¹ es [17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que P¹ tiene una secuencia seleccionada entre:

- H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
- H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
- H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
- H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
- H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA
- H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A y
- H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A

12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 11 que se selecciona entre:

- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Ac4c-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- H-H-Aib-QGFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂ y
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

- 5
13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂.
- 10
14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂.
- 15
15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂.
- 15
16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂.
- 20
17. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂.
- 20
18. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 que es: H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂.
- 25
19. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores mezclado con un vehículo, preferentemente en donde la composición es una composición farmacéutica y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30
20. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en un método de tratamiento médico.
- 30
21. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en:
- 35
- (i) un método de prevención del aumento de peso o de promoción de la pérdida de peso;
 - (ii) un método de disminución de los niveles circulantes de LDL y/o de aumento de la relación HDL/LDL;
 - (iii) un método de tratamiento de una afección provocada o **caracterizada por** un exceso de peso corporal; o
 - (iv) un método de prevención o de tratamiento de la obesidad, la obesidad mórbida, la obesidad mórbida antes de la cirugía, la inflamación vinculada a la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar vinculada a la obesidad, la apnea del sueño inducida por obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arterioesclerosis, la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica, el ictus o la enfermedad microvascular.
- 40
22. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 21 en donde el compuesto se administra como parte de una terapia de combinación junto con un agente para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la dislipidemia o la hipertensión.
- 45
23. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 22 en el que
- 50
- (i) el agente para el tratamiento de la diabetes es una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o una glinida, preferentemente nateglinida, un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista de GLP-1 diferente, una insulina o un análogo de insulina;
 - (ii) el agente para el tratamiento de la obesidad es un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, agonista del receptor peptídico YY o análogo del mismo, antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina, antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina, una combinación de inhibidor de recaptación de norepinefrina/dopamina y antagonista del receptor opioide, preferentemente una combinación de fentermina y topiramato, una combinación de bupropión y naltrexona o un agente serotoninérgico;
 - (iii) en donde el agente para el tratamiento de la hipertensión es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueante del receptor de angiotensina II, diurético, betabloqueante o bloqueante de los canales de calcio; o
 - (iv) el agente para el tratamiento de la dislipidemia es una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.
- 60