

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 394**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2010 PCT/CN2010/075548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10803913 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2460825**

54 Título: **Derivado del análogo del GLP-1 o sus sales farmacéuticas y su uso**

30 Prioridad:

**30.07.2009 CN 200910165559**

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

**20.12.2018**

73 Titular/es:

**JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL GROUP  
CO., LTD. (100.0%)  
The 10th Industrial Sub-zone of Development  
Zone Lianyungang  
Jiangsu 222047, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, YALI;  
LÜ, AIFENG;  
SUN, CHANGAN y  
YUAN, HENGLI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 694 394 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

Derivado del análogo del GLP-1 o sus sales farmacéuticas y su uso

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a una serie de derivados del análogo del péptido similar al glucagón humano tipo 1 (GLP-1) y sales farmacéuticas del mismo. Los derivados del análogo del GLP-1 proporcionados en esta invención tienen la función del GLP-1 humano y una semivida más larga *in vivo* comparada con el GLP-1 humano. La presente invención también se refiere al uso de los derivados del análogo del GLP-1, sus sales farmacéuticas, o composiciones farmacéuticas que contienen los derivados del análogo del GLP-1 o sus sales farmacéuticas en el tratamiento de diabetes no dependiente de insulina, diabetes dependiente de insulina u obesidad.

## 15 Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es una enfermedad epidémica mundial y es un síndrome de los trastornos metabólicos de la glucosa, las proteínas y los lípidos debido a la deficiencia absoluta o relativa de la insulina (Chen Ruijie. Status of research on diabetes drugs, Academic journal of Guangdong College of Pharmacy, 2001, 7 (2): 131-133). La diabetes mellitus se puede dividir en diabetes mellitus tipo I y diabetes mellitus tipo II (diabetes mellitus tipo 2, T2DM, la misma que se expone a continuación) de acuerdo con su patogenia. El 90-95% de todos los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus padecen T2DM, y los pacientes a menudo están acompañados de obesidad, una deficiencia de actividad física (inactividad física), edad más avanzada, antecedentes familiares de diabetes mellitus, un daño en el metabolismo de la glucosa y tener antecedentes familiares de diabetes mellitus y similares. T2DM es también una enfermedad progresiva. Según los datos estadísticos de 2000, la Organización Mundial de la Salud estimó que hay alrededor de 171 millones de personas en todo el mundo que padecen diabetes mellitus; en 2005, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE. UU. estimaron que hay 20.8 millones de estadounidenses que padecen diabetes mellitus, que es aproximadamente el 7% de la población de los Estados Unidos de América; en 2006, según las estadísticas de la Federación Internacional de Diabetes, el número global de pacientes que padecen diabetes mellitus es de aproximadamente 246 millones (aproximadamente el 5,9% de la población total mundial) y, además, el 46% de los pacientes tienen entre 40 y 59 años.

Los estudios han demostrado que existe una diferencia muy importante entre cómo responden a la glucosa las personas sanas y los pacientes con T2DM. La respuesta a la hiperglucemia postprandial de las personas sanas corresponde a la respuesta temprana a la insulina.

La T2DM se caracteriza por la inhibición de la secreción de la insulina y la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que resulta en una deficiencia de insulina y una hiperglucemia (Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. Endocr Rev. 1998, 19(4): 477-490). Los pacientes con T2DM típicamente sufren una hiperglucemia posprandial y en ayunas (glucosa en ayunas > 125 mg/dL), y el alto nivel de azúcar en la sangre se debe principalmente a que las células  $\beta$  pancreáticas no secretan suficiente insulina para compensar la deficiencia de insulina causada por la inhibición de la insulina en el tejido circundante (Weyer C., Bogardus C., Mott DM., et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J. Clin. Invest. 1999, 104(6): 787-794).

El principal factor de riesgo de T2DM es la obesidad, que es muy perjudicial para la salud humana. El riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular y una muerte anormal de los pacientes aumenta, mientras que la T2DM a menudo coexiste con otras enfermedades de alto riesgo como la hipertensión, la dislipemia y la obesidad; el 60% de los pacientes con T2DM están acompañados por complicaciones microvasculares, que incluyen retinopatía y neuropatía, y también están acompañados por morbilidades cardiovasculares asociadas con T2DM, como la enfermedad coronaria, el infarto de miocardio y el ataque fulminante, entre otros. En los Estados Unidos, Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la causa principal de morbilidad y muerte, y la T2DM es el principal factor de riesgo que causa complicaciones macrovasculares, tales como aterosclerosis, infarto de miocardio, ataque fulminante y enfermedades vasculares periféricas. El riesgo de muerte causado por enfermedades cardíacas y un ataque fulminante de un adulto con diabetes es de 2 a 4 veces mayor que el de una persona sin diabetes. Además, casi el 65% de las personas con diabetes mueren de enfermedades del corazón y de ataque fulminante.

Además del daño físico y fisiológico a los pacientes, la T2DM supone una gran carga económica para la sociedad. Según las estadísticas, el costo del tratamiento de las complicaciones asociadas con la diabetes es de aproximadamente \$ 22,9 mil millones, el costo total del tratamiento de la T2DM y las complicaciones de la misma son de casi \$ 57,1 mil millones, y el costo total no incluido en el presupuesto es de más de \$ 8 mil millones cada año en los Estados Unidos.

Los fármacos para el tratamiento de la T2DM han sido el foco, tal como los fármacos hipoglucémicos orales tempranos de la clase sulfonilo y la clase biguanida y el reciente sensibilizador de insulina y los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, el desarrollo de insulinas animales e insulinas humanas y una variedad de nuevas técnicas de formulación, la investigación de nuevos mecanismos de tratamiento farmacológico simplemente aumentando la

insulina, hasta nuevas formas que actúan sobre la producción de insulina. El aumento de peso es la reacción secundaria común después de la administración de agentes hipoglucemiantes orales o por inyección, que pueden reducir la conformidad y aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos tipos de medicamentos para el tratamiento de la T2DM que tienen alta seguridad, buena conformidad por parte del paciente y menos reacciones secundarias se convierte en el tema candente de las instituciones de investigación y las compañías farmacéuticas contra la diabetes.

Desde hace 100 años, Moore ha propuesto que el duodeno puede secretar un "estimulante químico" que puede estimular la secreción en el páncreas y ha intentado inyectar extracto de intestino para tratar la diabetes. Posteriormente, se ha descubierto que los factores humorales derivados de la secreción intestinal pueden mejorar la función del páncreas endocrino, y aproximadamente el 50% de la secreción de insulina inducida por la glucosa intravenosa u oral se deriva del estímulo de los péptidos producidos por el intestino. Por lo tanto Zunz y Labarre crearon el concepto de "incretina". Hasta el momento, se han aislado dos tipos de incretinas, a saber, el polipéptido insulino-trópico dependiente de la glucosa (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). Tanto el GIP como el GLP-1 son secretados por las células nerviosas intestinales específicas cuando el nutriente es absorbido, en el cual el GIP es secretado por las células K del duodeno y del yeyuno proximal, el GLP-1 se sintetiza en las células L y existe principalmente en el intestino delgado distal y el colon (Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003, 26 (10): 2929-2940).

El GLP-1 existe en dos formas bioactivas, a saber, GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida en el plasma, entre las cuales solo un aminoácido es diferente, y sus efectos biológicos y semivida *in vivo*, son similares (Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003, 26 (10): 2929-2940).

El GLP-1 al que normalmente se hace referencia es el nombre común del GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida. GIP y GLP-1 se degradarán a formas inactivas por la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) rápidamente después de su liberación en el tracto gastrointestinal, de modo que la semivida *in vivo* de GIP y GLP-1 es muy corta (la semivida *in vivo* de GIP es de aproximadamente 5-7 min, la semivida *in vivo* del GLP-1 es aproximadamente 2 min) (Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003, 26 (10): 2929-2940). Las investigaciones muestran que la mayor parte del proceso de degradación ocurre cuando el GIP y el GLP-1 entran en los vasos sanguíneos que contienen DPP-IV, y una pequeña cantidad del GLP-1 y GIP que no se han degradado entrarán en el páncreas y se unirán con sus sitios de unión para estimular las células  $\beta$  para liberar la insulina. A diferencia del mecanismo de la sulfonilurea para promover directamente las células  $\beta$  funcionales para liberar insulina, la mayor parte del efecto de la incretina depende de la glucosa. Además, algunas pruebas *in vitro* en animales y en humanos mostraron que GLP-1 también tiene funciones tales como la supresión de las células  $\alpha$  y la reducción de la hipersecreción de glucagón, etc.

Aunque los niveles del GIP en plasma en pacientes con T2DM son normales cuando la función de la incretina declina o disminuye significativamente, los niveles del GLP-1 en pacientes con T2DM disminuyen, por lo que los fármacos basados en GLP-1 contribuyen más al tratamiento de la T2DM. Aunque los niveles tanto del GLP-1 (7-37) como del GLP-1 (7-36) amida aumentarán durante varios minutos después de una comida, el contenido del GLP-1 (7-36) amida es mayor, por lo que la secreción del GLP-1 podría haberse incrementado en gran medida por el doble efecto del endocrino y la transmisión de la señal neural antes de que los alimentos digeridos ingresen al intestino delgado y al colon desde la parte inferior del tracto digestivo. El nivel en plasma del GLP-1 en estado de ayuno es muy bajo (alrededor de 5-10 pmol/L), y aumenta rápidamente después de comer (hasta 15-50 pmol/L). Bajo la doble función de DPP-IV y la eliminación renal, el nivel *in vivo* del GLP-1 en circulación disminuye rápidamente, mientras que el trabajo para investigar si otras enzimas como la endopeptidasa neutra humana 24 • 11 y similares también juegan un papel vital en la inactivación de la actividad del GLP-1 está en progreso, debido a que el segundo residuo de aminoácido del GLP-1 es una alanina que es un buen sustrato de DPP-IV, por lo que el GLP-1 es fácil de degradar en fragmentos de péptidos inactivos. De hecho, la DPP-IV *in vivo* es la razón clave para la pérdida de la actividad de la incretina. Los experimentos muestran que el nivel del GLP-1 en ratones, en los que el gen de DPP-IV ha sido silenciado, es significativamente más alto que en ratones normales, y la secreción de insulina también aumenta. Solo por la presencia de DPP-IV, el contenido *in vivo* del GLP-1 completo y biológicamente activo es solo el 10-20% del contenido total del GLP-1 en plasma (Deacon CF, Nauck MA, Toff-Nielsen M, et al. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide 1 are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type 2-diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*. 1995, 44 (9): 1126-1131).

El GLP-1 y el GIP desempeñan sus funciones respectivas a través de la unión a los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) que tienen estructuras completamente diferentes. La mayoría de los receptores del GIP son expresados por las células  $\beta$  pancreáticas, y una parte menor de los receptores del GIP son expresados por el tejido adiposo y el sistema nervioso central. En contraste, los receptores del GLP-1 se expresan principalmente en las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas y en los tejidos periféricos, incluidos los sistemas nervioso central y periférico, cerebro, riñón, pulmón y tracto gastrointestinal y similares. La activación de dos incretinas en las células  $\beta$  resultará en un rápido aumento del nivel de AMPc y calcio intracelular en las células, lo que llevará su secreción a la región extracelular de manera dependiente de la glucosa. La transmisión de señal sostenida desde los receptores de incretina se asocia con la proteína quinasa A, lo que resulta en la transcripción del gen, aumenta la biosíntesis de la insulina y estimula la proliferación de las células  $\beta$  (Gallwitz B. Glucagon-like peptide-1-based therapies for the

treatment of type 2 diabetes mellitus. *Treat Endocrinol.* 2005, 4 (6): 361-370). La activación del receptor del GLP-1 y el receptor del GIP también puede inhibir la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas de roedores y humanos, mientras que aumenta su supervivencia (Li Y, Hansotia T, Yusta B, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J. Biol Chem.* 2003, 278 (1): 471-478). En consonancia con la expresión del receptor del GLP-1, el GLP-1 también puede inhibir la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la ingesta de alimentos, y mejorar la degradación de la glucosa a través del mecanismo neural. Se debe tener en cuenta que, al igual que en otras reacciones de secreción de insulina, la función del GLP-1 para controlar el nivel de glucosa depende del glucagón, mientras que la función de glucagón para contrarrestar la liberación de glucagón causada por un bajo nivel de azúcar en la sangre ha sido completamente retenido incluso al nivel farmacológico del GLP-1.

El importante papel fisiológico del GLP-1 y del GIP endógenos en la homeostasis de la glucosa se ha estudiado en profundidad mediante el uso de antagonistas del receptor o ratones con genes desactivados. El antagonismo agudo del GLP-1 o GIP reduce la secreción de insulina *in vivo* de roedores y aumenta el contenido de glucosa en plasma. De manera similar, los ratones mutantes, en los cuales el receptor del GIP o del GLP-1 está inactivado, también experimentaron una secreción defectuosa de insulina estimulada por glucosa y dañaron la tolerancia a la glucosa. El GLP-1 también tiene la función de regular la glucosa en sangre en ayunas, porque los antagonistas agudos o el daño en el gen de GLP-1 causarán el aumento del nivel de glucosa en ayunas de los roedores; al mismo tiempo, el GLP-1 es la base del control de la glucosa en cuerpos humanos y los estudios sobre el antagonista de Exendina (9-39) han demostrado que la destrucción de la función del GLP-1 dará como resultado una secreción defectuosa de insulina estimulada por la glucosa, menor velocidad de eliminación de la glucosa, aumento de los niveles de glucagón y vaciamiento gástrico acelerado. Las funciones fisiológicas del GLP-1 (Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes.* 2004, 53 (9): 2181-2189) comprenden: (1) ayudar a organizar la absorción de glucosa, mediar la secreción de insulina dependiente de la glucosa; (2) inhibir la secreción posprandial de glucagón, reduciendo la liberación de glucosa hepática; (3) regulación del vaciado gástrico, evitando la circulación excesiva de glucosa cuando el alimento se absorbe en el intestino; (4) inhibición de la ingesta de alimentos (como el apetito). Los estudios en animales también mostraron un papel fisiológico del GLP-1 que estabiliza el número de células  $\beta$  pancreáticas *in vivo*.

Debido a los buenos efectos del GLP-1 y GIP para controlar el azúcar en la sangre y muchos otros aspectos, especialmente sus características que no producen hipoglucemia y retrasan el vaciado gástrico para controlar el peso atraen el interés de muchos científicos. Las personas intentan investigar fármacos basados en GLP-1 y GIP para el tratamiento de la T2DM. Es bien sabido que los pacientes con T2DM carecen o pierden el efecto de la incretina, en donde una de las razones es que el efecto de incretina de GIP *in vivo* en el paciente con T2DM se reduce significativamente; mientras tanto, el nivel del GLP-1 *in vivo* en un paciente con T2DM es muy bajo, y el nivel del GLP-1 causado por estímulos dietéticos se reduce significativamente (Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86 (8): 3717-3723). Debido a que el papel del GLP-1 *in vivo* en pacientes con T2DM se ha reservado parcialmente, la sinergia del GLP-1 es una de las direcciones de investigación de los fármacos diseñados para mejorar el efecto de la incretina en pacientes con T2DM.

El análogo del GLP-1, al igual que el GLP o GIP endógeno, pueden inhibir la liberación de glucagón *in vivo* y estimular la secreción *in vivo* de insulina de forma dependiente de la glucosa. Además, los análogos del GLP-1 tienen un papel en los siguientes síntomas: (1) bajo nivel de azúcar en la sangre. A diferencia de otros fármacos secretagogos, los análogos del GLP-1 promueven la secreción de insulina *in vivo* de una manera dependiente de la glucosa y, por lo tanto, su papel para disminuir la glucosa en sangre exhibe una autolimitación, que generalmente no causa hipoglucemia en grandes dosis. A pesar de que se ha informado en la literatura que el GLP-1 puede reducir el azúcar en la sangre a un nivel por debajo del nivel normal, este efecto es transitorio y se considera un resultado natural del GLP-1 que promueve la secreción de insulina. Debido a que la inactivación de la insulina tomará algún tiempo, cuando el efecto de estimulación del GLP-1 se reduce debido a la disminución del nivel de azúcar en la sangre mientras no hay una nueva secreción de insulina, la insulina original aún funciona. En pocas palabras, el GLP-1 puede reducir temporalmente el azúcar en la sangre a un nivel por debajo del nivel normal, pero no causa hipoglucemia grave y persistente; el papel de la saciedad y el peso corporal. Además de reducir directamente la glucosa en la sangre, el GLP-1 también puede reducir la cantidad de ingesta de alimentos, que se ha verificado en roedores y humanos. Por lo tanto, el nivel de glucosa en la sangre se puede controlar reduciendo indirectamente el peso corporal. El GLP-1 también tiene el papel potencial de inhibir la secreción de gastrina y ácido gástrico estimulados por la alimentación, y estas funciones muestran que el GLP-1 también puede tener un papel en la prevención de la úlcera péptica. Los mecanismos de acción del GLP-1 lo convierten no solo en un fármaco ideal para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2, sino también en el fármaco para el tratamiento de pacientes con diabetes por obesidad. GLP-1 puede mejorar la saciedad de los pacientes, reducir la ingesta de alimentos y mantener el peso corporal o perder peso; (3) mantener la salud de las células  $\beta$ . Varios estudios sugieren que el GLP-1 puede prevenir la conversión de una alteración de la tolerancia a la glucosa en diabetes, y algunas publicaciones informan que la clase de compuestos del GLP-1 tiene un efecto directo en el crecimiento y la proliferación de células  $\beta$  pancreáticas de animales experimentales, y se encontró mediante algunos experimentos, que GLP-1 puede promover la diferenciación de células madre pancreáticas en células  $\beta$  funcionales. Estos resultados sugieren que el GLP-1 tiene la función de proteger el islote pancreático y retrasar la progresión de la diabetes, y puede mantener las morfologías y funciones de las células  $\beta$ , mientras que reduce la apoptosis de las

células  $\beta$ ; (4) El efecto sobre la hiperglucemia posprandial. Este fenómeno representa una nueva dirección para el tratamiento de la T2DM. Debido a que algunos fármacos orales e insulinas exógenas no pueden inhibir o reducir la exorbitante secreción de glucagón en pacientes con T2DM, los análogos del GLP-1 pueden afectar la hipersecreción de glucagón mediante la inhibición directa de la liberación de glucagón o la inhibición paracrina del glucagón como resultado de la promoción de la secreción de insulina. La hiperglucemia posprandial puede reducirse eficazmente a través de estos dos mecanismos; mientras tanto, el mantenimiento de la función de las células  $\beta$  también puede desempeñar un papel en el control de la hiperglucemia posprandial a largo plazo.

Mientras tanto, los análogos del GLP-1 se administran a través de inyección subcutánea, que no necesita calcular la cantidad de carbohidratos para estimar la dosis óptima del medicamento, y no necesita un autocontrol de la glucosa en la sangre, lo que hace que estos tipos de medicamentos sean más fáciles de usar que la insulina.

Se ha confirmado una variedad de efectos del GLP-1 natural, que traen nuevas esperanzas para el tratamiento de la T2DM; sin embargo, el GLP-1 humano natural es muy inestable y puede ser degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y su semivida es de solo 1 ~ 2 minutos. Cuando se usa GLP-1 natural para disminuir el azúcar en la sangre, se necesita una infusión intravenosa continua o una inyección subcutánea continua, lo que resulta en una baja viabilidad clínica. Ante esta situación, los investigadores continúan explorando el método para extender el tiempo de acción del GLP-1. Por lo tanto, el desarrollo de análogos del GLP-1 de acción prolongada o sus derivados se convierte en un área importante de interés en el campo farmacéutico.

La Exenatida es una Exendina-4 sintética, desarrollada por Eli Lilly Company y Amylin Company con el nombre comercial Byetta®. La Exenatida ha sido aprobada para el tratamiento de la T2DM por la FDA y EMEA. Tiene 50% de homología con GLP-1 de mamífero en secuencia y tiene un sitio de afinidad similar al del receptor con GLP-1 (Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006, 368 (9548): 1696-1705), y está codificado por el gen específico del lagarto; en comparación con GLP-1, la alanina en posición 2 en GLP-1 se reemplaza con una glicina en Exenatida, que inhibe eficazmente la enzimólisis de la enzima DPP-IV, y su semivida *in vivo* es de aproximadamente 60-90 min (Kolterman OG, Kim DD, Shen L, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of Exenatida in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am Health Syst Pharm*. 2005, 62 (2): 173-181), la concentración *in vivo* de la Exenatida después de una inyección subcutánea única aumenta persistentemente y puede llegar a la concentración máxima en plasma después de 2 h aproximadamente, que puede mantenerse durante 4 a 6 h (Nielsen LL, Baron AD. Pharmacology of Exenatida (synthetic exendin-4) for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 2003, 4 (4): 401-05). Cabe señalar que el metabolismo de la Exenatida no se produce en el hígado, sino que se degrada principalmente por la proteína proteasa una vez que se filtra por glomérulos renales.

La Exenatida tiene actividades especiales de regulación de la glucosa, incluida la potenciación de la secreción de insulina dependiente de la glucosa, la inhibición dependiente de la glucosa de la excesiva secreción incorrecta de glucagón, la disminución del vaciado gástrico y la disminución de la ingesta de alimentos y similares. Los estudios *in vitro* e *in vivo* en los modelos de diabetes encontraron que la Exenatida también tiene los efectos de almacenar la primera etapa (primera fase) de la secreción de insulina, promoviendo la proliferación de células  $\beta$  y promoviendo la regeneración de la insulina a partir de su célula precursora.

Para lograr un mejor control de la glucosa en sangre, se necesita la inyección de Exenatida dos veces al día, lo que produce en los pacientes un gran inconveniente. Además, Exenatida también produce náuseas leves a moderadas (aproximadamente el 40% de los pacientes tendrá esta reacción), diarrea y vómitos (menos del 15% de los pacientes tienen ambas reacciones); aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con Exenatida pueden generar anticuerpos, aunque estos anticuerpos no afectan la eficacia o conducen a otros efectos clínicos. Recientemente se encontró que seis pacientes presentaron hemorragia o síntomas de pancreatitis necrotizante después de tomar Byetta.

CJC-1131 es un análogo del GLP-1 con resistencia a la peptidasa desarrollado por ConjuChem Biotechnologies Inc., en el que Ala en la posición 2 del GLP-1 se reemplaza con D-Ala para mejorar la capacidad de resistencia a la enzimólisis por DPP-IV, y cuya estructura contiene un enlazador reactivo activo que puede unirse a la albúmina de suero de manera covalente (no reversible) (Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, et al. Development and characterization of a glucagonlike peptide-1 albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor *in vivo*. *Diabetes* 2003, 52 (3): 751-759), y el complejo de GLP-1-albúmina de suero retiene la actividad del GLP-1, mientras aumenta la estabilidad a la enzimólisis por DPP-IV, extiende la duración de la acción *in vivo*, y la semivida en plasma del mismo es de aproximadamente 20 días.

Un estudio ha encontrado que la  $K_i$  era aproximadamente 12 nM (la  $K_i$  del GLP-1 es 5,2 nM) cuando el complejo de CJC-1131-albúmina de suero se une a células de ovario de hámster chino transfectadas con receptor del GLP-1 pancreático humano recombinante; mientras tanto, el valor de  $EC_{50}$  del AMPc de activación del complejo es de 11-13 nM, en el que el valor de  $EC_{50}$  es similar al del GLP-1. Las publicaciones existentes muestran que esta molécula de unión puede reducir el nivel de glucosa en sangre postprandial de los ratones cuyo nivel de azúcar en la sangre es normal o alto, y las pruebas muestran que esta actividad de CJC-1131 actúa sobre un cierto receptor funcional

del GLP-1, mientras tanto, en ratones CJC- 1131 también tiene un efecto en la desaceleración del vaciado gástrico e inhibe la ingesta de alimentos y similares.

5 Se completó parte del ensayo clínico de Fase II de CJC-1131. En septiembre de 2005, ConjuChem concluyó que CJC-1131 podría no ser adecuado para regímenes de dosificación crónica después del análisis de los resultados de las pruebas existentes, y suspendió el estudio clínico de CJC-1131. El ensayo clínico de CJC-1131 aún no se ha reiniciado.

10 Albugon (albúmina-GLP-1) es un fármaco de acción prolongada para el tratamiento de la T2DM desarrollado por GlaxoSmithKline autorizado por Human Genome Sciences Inc., que es una proteína de fusión del GLP-1 (con mutaciones que aumentan la resistencia a la DDP-IV) y albúmina. Su semivida en monos es de 3 días. La idea básica de su desarrollo es acoplar el GLP-1 recombinante y la albúmina sérica para formar un complejo; por lo tanto su semivida *in vivo* es significativamente mayor. La administración de Albugon reduce eficazmente el nivel de glucosa en la sangre de los ratones, aumenta la secreción de insulina, disminuye el vaciado gástrico y reduce la ingesta de alimentos, etc. (Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, et al. A Recombinant Human Glucagon-Like Peptide (GLP)-1-Albumin Protein (Albugon) Mimics Peptidergic Activation of GLP-1 Receptor-Dependent Pathways Coupled with Satiety, Gastrointestinal Motility, and Glucose Homeostasis. Diabetes 2004, 53 (9): 2492-2500). Actualmente Albugon se encuentra en fase III de ensayo clínico.

20 El documento WO9808871 divulga un derivado del GLP-1 que se obtiene a través de la modificación en GLP-1 (7-37) con ácido graso y la semivida *in vivo* del GLP-1 se mejora significativamente. El documento WO9943705 divulga un derivado del GLP-1, que se modifica químicamente en el terminal N, pero algunas publicaciones informan que la modificación de los aminoácidos en el terminal N disminuirá significativamente la actividad de todo el derivado del GLP-1 (J. Med. Chem. 2000, 43, 1664 1669). Además, los documentos CN200680006362, CN200680006474, 25 WO2007113205, CN200480004658, CN200810152147 y WO2006097538 etc., también divulgan una serie de análogos del GLP-1 o derivados del mismo producidos por modificación química o sustitución de aminoácidos, en la que el más representativo es la Liraglutida desarrollada por Novo Nordisk, cuyo ensayo clínico en fase III ha concluido. La Liraglutida es un derivado del GLP-1, cuya estructura contiene un análogo del GLP-1 cuya secuencia es un 97% homóloga con el GLP-1 humano, y este análogo del GLP-1 está enlazado con el ácido palmítico en forma 30 covalente para formar Liraglutida, en donde el ácido palmítico de la estructura de Liraglutida está unido a la albúmina sérica de manera no covalente, y estas características estructurales determinan que puede liberarse lentamente desde el lugar de la inyección sin cambiar la actividad del GLP-1 y la semivida se prolonga *in vivo*; mientras tanto, el ácido palmítico en la estructura formará un cierto impedimento estérico para prevenir la degradación por DPP-IV y para reducir la eliminación renal. Debido a las características descritas anteriormente, la semivida de Liraglutida en 35 el cuerpo humano administrada por inyección subcutánea es de aproximadamente 10-14 h, en teoría, se puede administrar una vez en el día y la dosis diaria es de 0,6-1,8 mg. El 23 de abril de 2009, Novo Nordisk anunció que el Comité de Productos Medicinales de Uso Humano (CHMP) de la EMEA realizó una evaluación positiva de Liraglutida y recomendó la aprobación de su listado. Novo Nordisk espera que la Comisión Europea apruebe su solicitud de inclusión dentro de dos meses.

40 Breve resumen de la invención

45 La presente invención pretende proporcionar una serie de derivados del análogo del GLP-1 que es mucho más activo y tiene una semivida más larga *in vivo*. El derivado del análogo del GLP-1 proporcionado en esta invención tiene la misma función que la del GLP-1 humano y tiene una semivida más larga *in vivo* comparado con GLP-1 humano.

50 La presente invención también pretende proporcionar una composición farmacéutica que comprende dicho derivado del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de diabetes mellitus no dependiente de insulina, diabetes dependiente de insulina y obesidad.

55 Los objetivos de la presente invención se consiguen mediante las siguientes soluciones técnicas. La presente invención proporciona una serie de derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho análogo del GLP-1 se selecciona de:

His-(D)-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Nle-Glu-Glu-  
Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Gln-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-  
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys;

His-(D)-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.3);

His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.4);

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.5);

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Sar-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.6);

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.7); y

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Sar-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.8),

en donde los derivados de dicho análogo del GLP-1 contienen un sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$ , en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3-$  y  $HOOC-$ ,  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25, en donde el sustituyente lipofílico de la fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\alpha$  del Lys C-terminal del análogo del GLP-1 están unidos por un enlace amida.

La presente divulgación proporciona una serie de derivados del análogo del GLP-1 que tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

X1-X2-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X10-Ser-X12-X13-X14-Glu-X16-X17-Ala-X19-X20-X21-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-X27-X28-X29-X30-X31-X32-X33-X34-X35-X36-X37-X38-X39-Lys

(I)

en donde dichos derivados del análogo del GLP-1 contienen un sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$ , en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3-$  y  $HOOC-$ ,  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25, X1, X2, X10, X12, X13, X14, X16, X17, X19, X20, X21, X24, X28, X29, X30, X31, X32, X33, X34, X35, X36, X37, X38 y X39 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido natural o no natural o los segmentos peptídicos que consisten en cualquier aminoácido natural o no natural.

Los derivados de dicho análogo del GLP-1 se refieren a un nuevo péptido GLP-1 obtenido mediante la sustitución parcial de aminoácidos o la extensión en el terminal C del péptido GLP-1 (7-37) humano que sirve como un precursor, que comprende GLP-1 (7-36) amida y GLP-1 (7-37), que tiene la misma función que la del GLP-1 humano.

Los derivados mencionados se refieren a la modificación química de los residuos de aminoácidos del análogo del GLP-1 mediante el uso de sustituyentes lipofílicos, en donde una modificación típica es formar una amida o un éster, preferiblemente, para formar una amida.

5 En una realización preferida de la invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino de los residuos de aminoácidos del análogo del GLP-1 están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3-$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25.

10 En otra realización preferida de la invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\epsilon$  de Lys en el C-terminal del análogo del GLP-1 están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3-$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25.

15 En otra realización preferida más de la invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\alpha$  de Lys en el C-terminal del análogo del GLP-1 están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona entre  $CH_3$  y  $HOOC$ , y  $n$  es un número entero seleccionado entre 8-25, y 14 es el más preferido.

20 En otra realización preferida de la invención, X1 en la secuencia de aminoácidos del análogo del GLP-1 se selecciona de L-His y D-His; X2 se selecciona de Ala, D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys y Aib; X10 se selecciona de Val y Leu; X12 se selecciona de Ser, Lys y Arg; X13 se selecciona de Tyr y Gln; X14 se selecciona de Leu y Met; X16 se selecciona de Gly, Glu y Aib; X17 se selecciona de Gln, Glu, Lys y Arg; X19 se selecciona de Ala y Val; X20 se selecciona de Lys, Glu y Arg; X21 se selecciona de Glu y Leu; X24 se selecciona de Val y Lys; X27 se selecciona de Val y Lys; X28 se selecciona de Lys, Glu, Asn y Arg; X29 se selecciona de Gly y Aib; X30 se selecciona de Arg, Gly y Lys; X31 se selecciona de Gly, Ala, Glu, Pro y Lys; X32 se selecciona de Lys y Ser; X33 se selecciona de Lys y Ser; X34 se selecciona de Gly, Ala y Ser; X35 se selecciona de Gly, Ala y Ser; X36 se selecciona de Pro y Gly; X37 se selecciona de Pro y Gly; X38 se selecciona de Pro y Gly; X39 se selecciona de Ser y Tyr.

En una realización más preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos del análogo del GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 120.

30 En otra realización preferida de la presente invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino de los residuos de aminoácidos del análogo del GLP-1, de los cuales la secuencia se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 120, están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3-$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25.

35 En una realización más preferida de la presente invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\epsilon$  de la Lys C-terminal del análogo del GLP-1, seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 120, están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona entre  $CH_3$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25.

40 En una realización más preferida de la presente invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo  $\alpha$  amino de la Lys C-terminal del análogo del GLP-1, seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 120, están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25, preferiblemente  $n$  se selecciona de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22, lo más preferiblemente,  $n$  es 14.

45 En una realización más preferida de esta invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\alpha$  de la Lys C-terminal del análogo del GLP-1, seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 20, están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  se selecciona entre  $CH_3$  y  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25, preferiblemente  $n$  se selecciona de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22, lo más preferiblemente,  $n$  es 14.

50 En otra realización más preferida de esta invención, el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amido  $\alpha$  de Lys C-terminal del análogo del GLP-1, seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 8, están unidos por un enlace amida, en el que  $R_1$  es  $CH_3$  y  $n$  es 14.

55 Los derivados de los análogos del GLP-1 proporcionados en esta invención pertenecen a compuestos anfóteros y los expertos en la técnica pueden convertirlos en sales al usar compuestos ácidos o alcalinos con tecnologías conocidas, en donde los ácidos que se usan generalmente para la formación de sales de adición de ácidos son: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético; las sales comprenden sulfato, piro-sulfato, trifluoroacetato, sulfito, bisulfito, fosfato, bifosfato, fosfato dihidrico, metafosfato, pirofosfato, bromuro, yoduro, acetato, propionato, octanoatos, acrilato, formiato, ácido isobutírico, hexanoato, enantatos, malonato, succinato, suberato, fumarato, maleato, 1,4-butinodioato, 1,6-hexinodioato, benzoato, cloro-benzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato,  $\gamma$ -hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, 1-naftol-sulfonato, 2-naftol-sulfonato, mandelato y similares, preferiblemente trifluoroacetato. Las

sustancias alcalinas también se pueden convertir en sales con derivados de los análogos del GLP-1, en donde las sustancias alcalinas comprenden amonio, hidróxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, y carbonato, bicarbonato, típicamente hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y similares.

5 Las composiciones farmacéuticas que contienen derivados del GLP-1 de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar pacientes que necesitan este tratamiento mediante la administración parenteral. La administración parenteral puede elegirse a partir de inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Los derivados del GLP-1 de la invención también pueden administrarse por vía transdérmica, tal como la administración a través de un  
10 parche (preferiblemente un parche de iontoforesis) y la administración a través de la mucosa.

15 Las composiciones farmacéuticas que contienen los derivados del GLP-1 de la invención se pueden preparar mediante técnicas comunes en el arte de la industria farmacéutica. Estas técnicas comprenden la disolución y mezcla adecuadas de los componentes para obtener las composiciones finales deseadas. Por ejemplo, los derivados del GLP-1 se disuelven en una cierta cantidad de agua, en donde el volumen de agua es ligeramente menor que el volumen final de la composición obtenida. Agentes isotónicos, conservantes, surfactantes y reguladores se agregan según la necesidad, en donde dichos agentes isotónicos son cloruro de sodio, manitol, glicerol, propilenglicol, azúcar o alditol. Dichos conservantes son fenol, orto-cresol, para-cresol, meta-cresol, éster de metilparahidroxibenzoato, alcohol bencílico. Dichos agentes reguladores apropiados son acetato de sodio, carbonato de sodio, glicina, histidina, lisina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato disódico, fosfato de sodio. Dichos  
20 tensioactivos son Poloxámero, Poloxámero 188, Poloxámero 407, Tween 80 y Tween 20. Si es necesario, las soluciones acuosas de ácidos como el ácido clorhídrico o alcalinas como la solución de hidróxido de sodio se agregan para ajustar los valores de pH de las soluciones, y finalmente el volumen de la solución se ajusta agregando agua para obtener la concentración requerida. Además de dichos componentes, las composiciones farmacéuticas de la invención también comprenden suficientes aminoácidos básicos u otros reactivos alcalinos que tienen la misma función para disminuir los agregados formados por la composición durante el almacenamiento, tales como lisina, histidina, arginina, imidazol durante el almacenamiento.

25 Los derivados de los análogos del GLP-1 de la invención se sintetizan manualmente, en donde la resina es resina HMPA-AM, el grupo amino  $\alpha$  de los derivados de aminoácidos está protegido por el Fmoc (fluoreno formil carbonilo), el cadena lateral tiol de la cisteína, la cadena lateral amido de glutamina, la cadena lateral imidazol de la histidina están protegidos por Trt (trifenilmetilo), la cadena lateral guanidilo de la arginina está protegida por Pbf (2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo), la cadena lateral indolilo de triptófano y la cadena lateral del grupo amino de la lisina están protegidos por Boc (terc-butoxicarbonilo), la cadena lateral hidroxilo de treonina, la cadena lateral fenilol de tirosina, la cadena lateral hidroxilo de la serina están protegidas por tBu (terc-butilo). El carboxilo de los aminoácidos C-terminales de la cadena peptídica única de los derivados peptídicos miméticos de eritropoyetina que se sintetizarán se conecta con una resina insoluble de alto peso molecular (resina amino Rink) a través de enlaces covalentes, y luego, los aminoácidos se unen a un portador en fase sólida que actúan como componentes amino, el grupo de protección amino se elimina con una solución de hexahidropiridina/DMF al 20%, y luego reacciona con  
30 derivados de aminoácidos en exceso para enlazar una cadena peptídica larga. La operación (condensación  $\rightarrow$  lavado  $\rightarrow$  desprotección  $\rightarrow$  lavado  $\rightarrow$  próxima ronda de condensación) se repite para lograr la longitud deseada de la cadena peptídica. Finalmente, la cadena peptídica se escinde de las resinas utilizando una mezcla de TFA:agua: 1,2-ditioglicol:triisopropilsilano (92,5:2,5:2,5:2,5), para obtener los derivados crudos de los análogos del GLP-1 mediante precipitación en un éter. Los monómeros peptídicos crudos se purifican utilizando una columna de fase inversa C18 y obteniendo así los derivados deseados de análogos del GLP-1. El método de prueba con ninhidrina se usó para controlar la condensación y las etapas de desprotección. Es decir, cuando hay aminoácidos libres en la cadena de resina-peptido, el reactivo de ninhidrina se mostrará azul y no mostrará ningún color cuando no haya aminoácidos libres (el reactivo de ninhidrina en sí es amarillo). Por lo tanto, después de que se completa la reacción de condensación, si muestra amarillo a través de la prueba de ninhidrina (color del reactivo de Ninhidrina por sí mismo), entonces sugiere que la etapa de acoplamiento se completa y la operación de desprotección antes de que se pueda realizar el siguiente acoplamiento de aminoácidos; Si la prueba muestra azul, sugiere que todavía hay algunos aminoácidos libres en las cadenas peptídicas, y es necesario repetir la etapa de acoplamiento o cambiar el agente de condensación existente hasta que las resinas peptídicas muestren una prueba de amarillo a ninhidrina.

55 Descripción detallada de la invención

Para describir la presente invención con más detalle, se proporcionan los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento.

60 Ejemplo 1 El método para la síntesis en fase sólida de HS-20001

1. Preparación de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

(1) secado e hinchamiento de la resina HMP-AM

65

Se colocaron 50 g (30 mmol) de resina HMP-AM (0,6 mmol/g) secados durante 24 horas al vacío en una botella de burbujeo de 2 litros, las resinas se hincharon con 500 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos, la DMF fue retirada, las resinas se lavan con DMF durante 1 minuto, la etapa de lavado se repite dos veces.

5 (2) Preparación de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

Acoplamiento de Fmoc-Lys (Mtt)-OH con la resina HMP-AM

10 Las resinas se lavan con 500 mL de DCM y luego se repite la etapa de lavado dos veces. Se disuelven 56,2 g (90 mmol) de Fmoc-Lys (Mtt)-OH y 11,4 g (90 mmol) de DIC en 1 L de DCM, luego se agregan a la resina HMP-AM hinchada, luego se agregan 366 mg (3 mmol) de DMAP para que reaccione durante 24 horas.

2) Lavado de la resina.

15 Después de la reacción, la resina se lava alternativamente con DMF e IPA dos veces, se lava con DMF 3 veces.

3) Protección del hidroxilo

20 Se disuelven 15,3 g (150 mmol) de anhídrido acético y 19,4 g (150 mmol) de DIEA en 1L de DMF y se agregan a la resina para reaccionar durante 10 minutos.

4) Lavado de la resina.

25 La resina se lava dos veces con 1 L de MeOH/DMF al 50%, DCM/DMF al 50%, y luego se lava con DCM tres veces y con etanol deshidratado tres veces. Después de secarse al vacío, se obtiene la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM.

(3) Ensayos de carga de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

30 Se colocan 5-10 mg de resina en forma precisa en 1 mL de solución de hexahidropiridina/DMF al 20%, se agita durante 20 minutos, luego se toma 50  $\mu$ L de sobrenadante con una pipeta y se diluye en 2,5 mL de DMF.

Muestras del blanco: se toman 50  $\mu$ L de Hexahidropiridina/DMF al 20% con una pipeta y se diluyen en 2,5 mL de DMF.

35 El grado de sustitución se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Sub} = (A \times 51)/(7,8 \times m)$$

en la que A es el valor de absorción de UV a 301 nm; m es el peso de la resina, la unidad es mg.

40 2. Secado e hinchamiento de la resina sintetizada en fase sólida.

Se colocaron 50 g (20 mmol) de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM (0,4 mmol/g) secados al vacío durante 24 h en una botella de burbujeo de 2 L, luego se agregaron 500 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) para hinchar la resina durante 30 minutos, luego se retira la solución de DMF.

45

3. Eliminación del grupo protector 4- metiltrifenilmetilo (Mtt) de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM

50 La resina se lava con 200 mL de DCM dos veces, luego se agregan 1.200 mL de TFA /DCM al 1% (el TFA esta en un exceso de aproximadamente 8 veces) para eliminar el grupo protector Mtt durante 1 h, la resina se lava alternativamente con 200 mL de N,N-diisopropil etilamina (DIEA)/DMF al 5%, y DMF tres veces, luego se lava con DMF por tres veces.

4. Condensación de ácido palmítico.

55 Se disuelven 50 mmol de ácido palmítico y 50 mmol de 3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-fentriazina-4-cetona (DEPBT) en 400 mL de DMF, luego se agregan 100 mmol de DIEA y se agitan durante 3 minutos a temperatura ambiente, dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar en baños de agua a 37°C durante 2 h bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Después de la reacción, la solución de reacción se retira, la resina se lava con DMF, alcohol isopropílico (IPA) y DMF en forma sucesiva.

60

5. Eliminación del grupo protector 9-Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) de la resina Fmoc-Lys (ácido N- $\epsilon$ -palmítico)-HMPA-AM

65 Se colocan 200 mL de solución de piperidina /DMF al 20% en una botella de burbujeo llena de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM, se hacen reaccionar durante 5 minutos y luego se extraen, luego se agregan 200 mL de solución

de piperidina/DMF al 20% para reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la reacción, la resina se lava con 200 mL de DMF cuatro veces.

#### 6. Síntesis en fase sólida de la cadena peptídica que hace parte de HS-20001

##### 1) Condensación de Fmoc-Ser(tBu)-OH

Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Ser(tBu)-OH en 125 mL de 1-hidroxibenzo triazol (HOBt)/DMF 0,4M, luego se agregan 125 mL N'-diisopropil carbodiimida (DIC)/DCM 0,4MN, para activar y se hace reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente; dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar bajo la protección del nitrógeno a temperatura ambiente y se usa ninhidrina para detectar y controlar el grado de la reacción. Después de la reacción, se elimina la solución de reacción; La resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.

##### 2) Extensión de la cadena peptídica.

Se sintetiza el péptido de la resina HS-20001 de acuerdo con la secuencia de la cadena peptídica de HS-20001 desde el terminal amino (N-terminal) hasta terminal carboxi (C-terminal) (His-(D)-Ala-Glu)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Nle-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Gln-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser), en donde las cantidades de aminoácidos y reactivos de condensación son las mismas que las cantidades de Fmoc-Ser(tBu)-OH, los aminoácidos protegidos son Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-D-Ala-OH y Fmoc-His(Trt)-OH respectivamente, y se repiten las reacciones de condensación y desprotección.

##### 3) Procesamiento posterior del péptido de la resina HS-20001

Dicho péptido de la resina HS-20001 obtenido en la etapa 2) se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva, se lava con éter absoluto dos veces, luego se seca al vacío y se obtiene el péptido de la resina HS-20001.

##### 4) Preparación del péptido crudo de HS-20001

Las resinas peptídicas secas HS-20001 reaccionaron con lisado fresco, de ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano (TIS): agua = 95:2,5:2,5 (en volumen y 10 mL totales de lisado por gramo de resina seca) durante 4h a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra después de la reacción, la resina se lava con TFA dos veces, el filtrado se recoge y se combina, y se concentra hasta un 1/3 del volumen original mediante evaporación rotatoria, HS-20001 se precipita y se lava con éter absoluto frío, después se centrifuga y se seca al vacío, se obtiene HS-20001 cruda de color blanco.

##### 5) Preparación de HS-20001 con cromatografía líquida de fase inversa

Se disuelven 10 g de HS-20001 cruda en una cierta cantidad de agua, se filtran con un filtro de membrana de 0,45 µm, luego se purifican con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), en donde la fase móvil es A TFA /H<sub>2</sub>O al 0,1%, B TFA/acetronitrilo al 0,1%, en donde, la columna es la columna Denali C-18 (diámetro de partícula 8,3 µm, 5×30 cm), la temperatura de la columna es de 45°C, la longitud de onda de detección es de 220 nm, el flujo es de 120 mL/min. Los picos del producto se recogen, se concentran al vacío para eliminar la mayor parte del acetronitrilo, luego se obtiene 2,25 g del producto de HS-20001 mediante liofilización, cuya pureza es del 98,5%, el rendimiento es del 22,5%.

#### Ejemplo 2: El método de síntesis en fase sólida para HS-20002

##### 1. Preparación de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

Véase el Ejemplo 1.

##### 2. Secado e hinchamiento de la resina sintetizada en fase sólida.

Se colocan 50 g (20 mmol) de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM (0,4 mmol/g) secada durante 24 h al vacío en una botella de burbujeo de 2 litros, la resina se hincha con 500 mL de DMF durante 30 minutos, luego se retira la solución de DMF.

##### 3. Eliminación del grupo protector Mtt de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM

La resina se lava con 200 mL de DCM dos veces, se elimina el grupo protector Mtt agregando 1.200 mL de TFA /DCM al 1% (el TFA está aproximadamente 8 veces en exceso) durante 1 h, luego se lava con 200 mL de DIEA/DMF al 5% y DMF alternativamente por tres veces, luego se lava con DCM por tres veces.

## 4. Condensación de ácido palmítico

Se disuelven 50 mmol de ácido palmítico y 50 mmol de DEPBT en 400 mL de DMF, y luego se agregan 100 mmol de DIEA mediante agitación para reaccionar durante 3 minutos a temperatura ambiente, dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar en baños de agua a 37°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 horas. Después de la reacción, la solución de reacción se elimina y la resina se lava con DMF, alcohol isopropílico (IPA) y DMF en forma sucesiva.

## 5. Eliminación del grupo protector Fmoc de la resina HMPA-AM Fmoc-Lys (ácido N-ε-palmítico)

Se colocaron 200 mL de solución de Piperidina/DMF al 20% en una botella de burbujeo llena con resina de Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM, se retiró después de reaccionar durante 5 minutos, luego se agregaron 200 mL de solución de Piperidina/DMF al 20% para reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la resina se lava cuatro veces con 200 mL de DMF.

## 6. Método de síntesis en fase sólida para la parte de la cadena peptídica de HS-20002

## 1) Condensación de Fmoc-Ser(tBu)-OH

Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Ser(tBu)-OH en 125 mL de HOBt/DMF 0,4 M, luego se agregan 125 mL de DIC/DCM 0,4 M para activar y hacer reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente; dicha solución se coloca en la resina y se hace reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente, y se usa la prueba con ninhidrina para detectar y controlar el grado de la reacción. Después de la reacción, la solución de reacción se elimina y la resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.

## 2) Extensión de la cadena peptídica.

Se sintetiza el péptido de la resina HS-20002 de acuerdo con la secuencia de la cadena peptídica de HS-20002 desde el N-amino (N-terminal) hasta el carboxi-terminal (C-terminal) (His-Gly-Glu-Gly- Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly- Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser), en donde las cantidades de aminoácidos y reactivos de condensación son las mismas que las de Fmoc-Ser(tBu)-OH, los aminoácidos protegidos son Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln (Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH y Fmoc-His(Trt)-OH respectivamente, y se repiten las reacciones de condensación y desprotección.

## 3) Procesamiento posterior del péptido de la resina HS-20002

Dicho péptido de la resina HS-20002 obtenido en la etapa 2) se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva, se lava dos veces con éter absoluto, luego se seca al vacío, se obtiene finalmente el péptido de la resina HS-20002.

## 4) Preparación del péptido crudo de HS-20002

El péptido de la resina HS-20002 seca se hace reaccionar con lisado fresco de ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano (TIS):agua:1,2-etanoditiol (EDT) = 94:1:2,5:2,5 (por volumen y 10 mL totales de lisado por gramo de la resina seca) durante 4 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra después de la reacción, la resina se lava con TFA dos veces, el filtrado se recoge y se combina, y se concentra hasta 1/3 del volumen original mediante evaporación rotatoria, HS-20002 se precipita con éter absoluto frío, después se centrifuga y se seca al vacío, se obtiene HS-20002 cruda de color blanco.

## 5) Preparación de HS-20002 con cromatografía líquida de fase inversa.

Se disuelven 10 g de HS-20002 cruda en una cierta cantidad de agua, se filtran con un filtro de membrana de 0,45 µm, luego se purifica con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), en donde la fase móvil es A TFA/H<sub>2</sub>O al 0.1%, B TFA/acetonitrilo al 0,1%, en donde la columna es Denali C-18 (diámetro de partícula 8.3µm, 5×30 cm), la temperatura de la columna es de 45°C, la longitud de onda de detección es de 220 nm, el flujo es de 120 mL/min. Los picos del producto se recolectan, se concentran al vacío para eliminar la mayor parte del acetonitrilo, luego se obtienen 2,1 g del producto de HS-20002 por liofilización, cuya pureza es del 98%, el rendimiento es del 20,5%.

## Ejemplo 3: Método de síntesis en fase sólida para HS-20003

## 1. Preparación de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

Véase el Ejemplo 1.

## 2. Secado e hinchamiento de la resina sintetizada en fase sólida.

Se colocan 50 g (20 mmol) de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM (0,4 mmol/g) secados durante 24 h al vacío en una botella de burbujeo de 2 litros, la resina se hincha con 500 mL de DMF durante 30 minutos, luego la solución de DMF se elimina.

## 3. Eliminación del grupo protector Fmoc de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM

Se añaden 200 mL de solución de piperidina/DMF al 20% a una botella de burbujas llena de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM, la solución se elimina después de 5 min, y luego se agregan 200 mL de solución de piperidina/DMF al 20% y se deja reaccionar durante otros 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la reacción, la resina se lava con 200 mL de DMF cuatro veces.

## 4. Condensación del ácido palmítico

Se disuelven 50 mmol de ácido palmítico y 50 mmol de DEPBT en 400 mL de DMF, luego se agregan 100 mmol de DIEA agitando para reaccionar durante 3 minutos a temperatura ambiente, dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar en baños de agua a 37°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 horas. Después de la reacción, la solución de reacción se elimina y la resina se lava con DMF, alcohol isopropílico (IPA) y DMF en forma sucesiva.

## 5. Eliminación del grupo protector Mtt de la resina de ácido palmítico-Lys (Mtt)-HMPA-AM

La resina se lava con 200 mL de DCM dos veces, el grupo protector Mtt se elimina mediante la adición de 1200 mL de TFA/DCM al 1% (el TFA está en un exceso de aproximadamente 8 veces) para reaccionar durante 1 h. La resina se lava con 200 mL de DIEA/DMF al 5% y DMF alternativamente tres veces, luego se lava con DCM tres veces.

## 6. Método de síntesis en fase sólida para la parte de la cadena peptídica de HS-20003

## 1) Condensación de Fmoc-Ser(tBu)-OH

Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Ser(tBu)-OH y 50 mmol de DEPBT en una cierta cantidad de DCM, luego se agregan 100 mmol de DIEA para la activación durante 3 minutos a temperatura ambiente; dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y se usa ninhidrina para detectar y controlar el grado de reacción. Después de la reacción, la solución de reacción se retira y la resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.

## 2) Extensión de la cadena peptídica.

Se sintetiza el péptido de la resina HS-20003 de acuerdo con la secuencia de la cadena peptídica de HS-20003 desde el N-amino (N-terminal) al carboxi-terminal (C-terminal) (His-(D)-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser), en donde las cantidades de aminoácidos y reactivos de condensación son las mismas que las de Fmoc-Ser(tBu)-OH, los aminoácidos protegidos son Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH respectivamente, y se repiten las reacciones de condensación y desprotección.

## 3) Procesamiento posterior del péptido de la resina HS-20003

Dicho péptido de la resina HS-20003 obtenida en la etapa 2) se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva, se lava dos veces con éter absoluto, luego se seca al vacío y se obtiene finalmente el péptido de la resina HS-20003.

## 4) Preparación del péptido crudo de HS-20003

El péptido de la resina HS-20003 seca se hace reaccionar con lisado fresco de ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano (TIS):agua = 95:2,5:2,5 (en volumen y 10 mL totales de lisado por gramo de resina seca) durante 4 h a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra después de la reacción, la resina se lava con TFA dos veces, el filtrado se recoge y se combina, y se concentra hasta un 1/3 del volumen original a través de evaporación rotatoria, se precipita HS-20003 con éter frío con agitación, después de la centrifugación y secado al vacío, se obtiene finalmente el crudo blanco HS-20003.

## 5) Preparación de HS-20003 con cromatografía líquida de fase inversa.

Se disuelven 10 g de HS-20003 cruda en una cierta cantidad de ácido acético/agua al 20% y se agitan durante al menos 4 h, luego se filtra con un filtro de membrana de 0,45 µm, luego se purifica con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), en donde la fase móvil es A TFA/H<sub>2</sub>O al 0,1%, B TFA/acetonitrilo al 0,1%,

en donde, la columna es Denali C-18 (diámetro de partícula 8,3  $\mu\text{m}$ , 5 $\times$ 30 cm), la temperatura de la columna es de 45°C, longitud de onda de detección es de 220 nm, el flujo es de 120 mL/min. Los picos del producto se recogen, se concentran con descompresión para eliminar la mayor parte del acetonitrilo, luego se obtienen 2,5 g del producto de HS-20003 mediante liofilización, cuya pureza es del 98,5%, el rendimiento es del 25%.

- 5 Ejemplo 4: El método de síntesis en fase sólida para HS-20004
1. Preparación de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM
- 10 Véase el Ejemplo 1.
2. Secado e hinchamiento de la resina sintetizada en fase sólida.
- 15 Se colocaron 50 g (20 mmol) de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM (0,4 mmol/g) secados durante 24 h al vacío en una botella de burbujeo 2L, se agregaron 500 mL de DMF para hinchar la resina durante 30 minutos, se elimina la solución de DMF.
3. Eliminación del grupo protector Fmoc de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM
- 20 Se añaden 200 mL de solución de piperidina/DMF al 20% a una botella de burbujas llena de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMPA-AM, y luego se elimina después de 5 min, y luego se agregan 200 mL de solución de piperidina/DMF al 20% para reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la reacción, la resina se lava con 200 mL de DMF cuatro veces.
- 25 4. Condensación del ácido palmítico
- Se disuelven 50 mmol de ácido palmítico y 50 mmol de DEPBT en 400 mL de DMF, y luego se agregan 100 mmol de DIEA agitando durante 3 minutos a temperatura ambiente, dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar en baños de agua a 37°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 horas. Después de la reacción, la solución de reacción se elimina y la resina se lava con DMF, alcohol isopropílico (IPA) y DMF en forma sucesiva.
- 30 5. Eliminación del grupo protector Mtt de la resina de ácido palmítico-Lys (Mtt)-HMPA-AM
- La resina se lava con 200 mL de DCM dos veces, se elimina el grupo protector Mtt agregando 1.200 mL de TFA/DCM al 1% (el TFA está aproximadamente 8 veces en exceso) para reaccionar durante 1 h, luego se lava con DIEA/DMF al 5% y DMF alternativamente por tres veces, luego se lava con DCM por tres veces.
- 35 6. Método de síntesis en fase sólida para la parte de la cadena peptídica de HS-20004
- 40 1) Condensación de Fmoc-Ser(tBu)-OH
- Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Ser(tBu)-OH y 50 mmol de DEPBT en una cierta cantidad de DCM, luego se agregan 100 mmol de DIEA para activación durante 3 minutos a temperatura ambiente; dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y se usa ninhidrina para detectar y controlar los grados de la reacción. Después de la reacción, la solución de reacción se elimina; la resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.
- 45 2) Extensión de la cadena peptídica
- 50 Se sintetiza el péptido de la resina HS-20004 de acuerdo con la secuencia de la cadena peptídica de HS-20004 desde el N-amino (N-terminal) al carboxi-terminal (C-terminal) (His-Aib-Glu-Gly)-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser), en donde las cantidades de aminoácidos y reactivos de condensación son las mismas que las de Fmoc-Ser(tBu)-OH, los aminoácidos protegidos son Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Aib-OH y Fmoc-His(Trt)-OH respectivamente y se repiten las reacciones de condensación y desprotección.
- 55 3) Procesamiento posterior del péptido de la resina HS-20004
- 60 Dicho péptido de la resina HS-20004 obtenido en la etapa 2) se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva, se lava dos veces con éter absoluto, luego se seca al vacío, finalmente se obtiene el péptido de la resina HS-20004.
- 65 4) Preparación del péptido crudo de HS-20004

El péptido de la resina HS-20004 seco se hace reaccionar con lisado fresco de ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano (TIS): agua = 95:2,5:2,5 (en volumen y 10 mL totales de lisado por gramo de resina seca) durante 4 h a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra después de la reacción, la resina se lava con TFA dos veces, el filtrado se recoge y se combina, y se concentra a 1/3 del volumen original a través de evaporación rotatoria, se precipita HS-20004 con éter frío bajo agitación, después de la centrifugación y secado al vacío, se obtiene finalmente HS-20004 como un crudo blanco.

#### 5) Preparación de HS-20004 con cromatografía líquida de fase inversa

Se disuelven 10 g de HS-20002 en bruto en una cierta cantidad de ácido acético/agua al 20% y se agitan durante al menos 4 h, luego se filtran con un filtro de membrana de 0,45 µm, luego se purifican con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), en donde la fase móvil es A TFA/H<sub>2</sub>O al 0,1%, B TFA/acetonitrilo al 0,1%, el gradiente es el siguiente: en donde, la columna es la columna Denali C-18 (diámetro de partícula 8,3 µm, 5 × 30 cm), la temperatura de la columna es de 45°C, la longitud de onda de detección es de 220 nm, la velocidad de flujo es de 120 mL/min. Los picos del producto se recolectan, se concentran al vacío para eliminar la mayor parte del acetonitrilo, luego se obtiene, 2,25 g del producto de HS-20004 por liofilización, cuya pureza es de 98,5%, el rendimiento es de 22,5%.

#### Ejemplo 5: El método de síntesis en fase sólida para HS-20005

El método de preparación de HS-20005 es el mismo que el descrito en el ejemplo 4, en donde la diferencia es que la secuencia de aminoácidos se reemplaza con la SEQ ID NO: 5, y se obtienen 2,5 g de producto HS-20005, del cual la pureza es de 98,5%, el rendimiento es de 25%.

#### Ejemplo 6: El método de síntesis en fase sólida para HS-20006

El método de preparación de HS-20006 es el mismo que el descrito en el ejemplo 4, en el que la diferencia es que la secuencia de aminoácidos se reemplaza con la SEQ ID NO: 6, y se obtienen 2,25 g del producto HS-20006, de los cuales la pureza es de 98,5%, el rendimiento es de 22,5%.

#### Ejemplo 7: El método de síntesis en fase sólida para HS-20007

El método de preparación de HS-20007 es el mismo que el descrito en el ejemplo 4, en el que la diferencia es que la secuencia de aminoácidos se reemplaza con la SEQ ID NO: 7, y se obtienen 2,1 g del producto HS-20007, de los cuales la pureza es del 98%, el rendimiento es del 20,5%.

#### Ejemplo 8: El método de síntesis en fase sólida para HS-20008

El método de preparación de HS-20008 es el mismo que el descrito en el ejemplo 4, en donde la diferencia es que la secuencia de aminoácidos se reemplaza con la SEQ ID NO: 8, y se obtienen 2,5 g de producto HS-20008, del cual la pureza es de 98,5%, el rendimiento es de 25%.

Ejemplo de referencia del método de síntesis en fase sólida para Liraglutida.

#### 1. Preparación de la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

(1) Secado e hinchado de la resina HMP-AM.

Se colocan 50 g (30 mmol) de resina HMP-AM (0,6 mmol/g) secada durante 24 h al vacío en una botella de burbujeo de 2 L, se añaden 500 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) para hinchar la resina durante 30 minutos, la solución de DMF se retira, se agrega DMF para lavar la resina durante 1 minuto, la etapa de lavado se repite dos veces.

(2) Preparación de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

#### 1) Acoplamiento de resina Fmoc-Lys (Mtt)-OH y HMP-AM

La resina se lava con 500 mL de DCM tres veces, se disuelven 56,2 g (90 mmol) de Fmoc-Lys (Mtt)-OH y 11,4 g (90 mmol) de DIC en 1 L de DCM, luego se agregan a la resina HMP-AM hinchada, luego se agregan 366 mg (3 mmol) de DMAP para dejar reaccionar durante 24 h;

2) Lavado de la resina.

Después de la reacción, la resina se lava alternativamente con DMF e IPA dos veces, se lava con DMF 3 veces.

#### 3) Protección de hidroxilo

Se disuelven 15,3 g (150 mmol) de anhídrido acético y 19,4 g (150 mmol) de DIEA en 1 L de DMF y se agregan a la resina para reaccionar durante 10 minutos.

#### 4) Lavado de la resina

La resina se lava con 1 L de MeOH/DMF al 50%, DCM/DMF al 50% dos veces, se lava con DCM tres veces, se lava con etanol absoluto tres veces y luego se seca al vacío para obtener la resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM.

#### (3) Ensayos de carga de resina Fmoc-Lys (Mtt)-HMP-AM

Se colocan 5 ~ 10 mg de resina en forma precisa en 1 mL de solución de hexahidropiridina/DMF al 20%, se agita durante 20 minutos, luego se toman 50 µL de sobrenadante con una pipeta y se diluye en 2,5 mL de DMF; Muestras de blanco: se toman 50 µL hexahidropiridina/DMF al 20% con una pipeta y se diluye en 2,5 mL de DMF; El grado de sustitución se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Sub} = (A \times 51) / (7,8 \times m)$$

en donde A es el valor de absorción de UV a 301 nm; m es la cantidad de la resina, la unidad es mg.

#### 2. Secado e hinchado de la resina de la síntesis en fase sólida

Se colocan 50 g (20 mmol) de resina Fmoc-Gly-HMP-AM (0,4 mmol/g) secada durante 24 horas al vacío en una botella de burbujeo de 2 litros, luego se agregan 500 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) para hinchar la resina durante 30 minutos, la solución DMF se elimina.

#### 3. El método de síntesis en fase sólida de la parte de la cadena peptídica de Liraglutida

##### 1) Condensación de Fmoc-Arg(Pbf)-OH

Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Arg(Pbf)-OH en 125 mL de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)/DMF 0,4 M, luego se agregan 125 mL de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/DCM 0,4 M para activar y reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente; dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente, y se usa la prueba con ninhidrina para detectar y controlar los grados de la reacción. Después de la reacción, la solución de reacción se retira; la resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.

##### 2) Extensión de la cadena peptídica

El péptido precursor de Liraglutida se sintetiza de acuerdo con la secuencia de la cadena peptídica de Liraglutida desde el N-amido (N-terminal) hasta el carboxi-terminal (C-terminal) (His-Ala-Glu-Gly-Thr- Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly), en donde las cantidades de aminoácidos y reactivos de condensación son las mismas que las de Fmoc-Arg(Pbf)-OH, los aminoácidos protegidos son Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys (Mtt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH respectivamente, y se repiten las reacciones de condensación y desprotección.

##### 3) Eliminación del grupo protector Mtt del péptido precursor de Liraglutida

La resina se lava con 200 mL de DCM dos veces, el grupo protector Mtt se elimina dos veces agregando 1.200 mL de TFA/DCM al 1% (el TFA está aproximadamente 8 veces en exceso) para reaccionar durante 1 h, la resina se lava alternativamente con 200 mL de N,N-diisopropiletilamina (DIEA)/DMF al 5% y DMF tres veces, se lava 3 veces con DMF.

##### 4) Modificación del péptido precursor de Liraglutida con ácido palmítico

Se disuelven 50 mmol de Fmoc-Glu-OtBu en 125 mL de 1-hidroxibenzo triazol (HOBt)/DMF 0,4 M, luego se agregan 125 mL de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/DCM 0,4 M para activar y reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente; dicha solución se agrega a la resina, se hace reaccionar bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y se usa ninhidrina para detectar y controlar los grados de la reacción. Después de la reacción, la solución de reacción se retira, la resina se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva.

Se agregan 1 L de PIP/DMF al 20% para eliminar el grupo protector Fmoc durante 5 minutos, luego se retiran, luego se agrega 1 L de PIP/DMF al 20% para eliminar el grupo protector Fmoc durante 20 minutos, luego se retiran, la resina se lava con DMF cuatro veces.

Se disuelven 50 mmol de ácido palmítico y 50 mmol de 3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-fentriazina-4-cetona (DEPBT) en 400 mL de DMF, luego se añaden 100 mmol de DIEA para reaccionar durante 3 minutos bajo agitación a temperatura ambiente. La solución se agrega a la resina, se hace reaccionar en baños de agua a 37°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 h. Después de la reacción, la solución de reacción se retira, la resina se lava con DMF, alcohol isopropílico (IPA) y DMF en forma sucesiva.

4. Procesamiento posterior del péptido de la resina de Liraglutida.

Dicho péptido de la resina de Liraglutida obtenido en la etapa (2) se lava con DMF, IPA y DMF en forma sucesiva, se lava tres veces con DCM, se lava dos veces con éter absoluto, luego se seca al vacío, se obtiene finalmente el péptido de la resina de Liraglutida.

5. Preparación de péptido crudo de Liraglutida

El péptido de la resina seca de Liraglutida se hace reaccionar con lisado fresco de ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano (TIS): agua = 95:2,5:2,5 (en volumen y 10 mL totales de lisado por gramo de resina seca) durante 4 h a temperatura ambiente. La solución de reacción se filtra después de la reacción, la resina se lava con TFA dos veces, el filtrado se recoge y se combina, se concentra a 1/3 del volumen original mediante evaporación rotatoria, se precipita la Liraglutida con éter absoluto frío, después de la centrifugación y el secado al vacío, se obtiene HS-20001 como un el crudo blanco.

5) Preparación de Liraglutida con cromatografía líquida de fase inversa

Se disuelven 10 g de Liraglutida cruda en una cierta cantidad de solución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, se filtran con un filtro de membrana de 0,45 µm, luego se purifican con cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), donde la fase móvil es A TFA/H<sub>2</sub>O al 0,1%. B TFA/acetonitrilo al 0,1%, en donde, la columna es la columna Denali C-18 (diámetro de partícula 8,3µm, 5 × 30 cm), la temperatura de la columna es de 45°C, la longitud de onda de detección es de 220 nm, la velocidad de flujo es de 120 mL/min. Los picos del producto se recogen, se concentran con descompresión para eliminar la mayor parte del acetonitrilo, luego se obtienen 2,25 g de producto de Liraglutida por liofilización, cuya pureza es del 98%, el rendimiento es del 12,5%.

Ejemplo experimental 1: Prueba de la actividad agonista de los compuestos en el receptor del péptido de glucagón tipo 1 (GLP1R)

El GLP1R es un receptor acoplado con la proteína Gs, cuya unión a los agonistas dará como resultado el aumento de la concentración de AMPc intracelular. En el presente experimento, se cotransfectan GLP1R y el plásmido del gen informador de luciferasa regulado por elementos de respuesta de AMPc en células HEK293. Cuando el compuesto se une al receptor y activa los receptores, la expresión de la luciferasa aumentará. El estado de activación del compuesto para GLP1R se puede aprender probando la actividad de la luciferasa.

No. de medicamentos analizados	Cantidad (mg)	DMSO (µL)	Concentración final (mM)
Liraglutida	2	53,31556	10
HS-20001	2	43,81871	10
HS-20002	2	43,91502	10
HS-20003	2	44,99387	10
HS-20004	2	44,8526	10
HS-20005	2	43,81871	10
HS-20006	2	43,91502	10
HS-20007	2	44,99387	10
HS-20008	2	44,8526	10

Procedimientos experimentales:

1. Las células HEK293 transfectadas de manera estable con GLP1R y el plásmido pCRE-Luc se implantan en una placa de 96 pozos con la cantidad de 40.000 células/pozo/100 µL y se incuban a 37°C durante 24 h.

2. Se añaden los compuestos o fármacos positivos que tienen un cierto gradiente de concentración (3 pozos por concentración) y se incuban a 37°C durante 5 h. El control negativo es el disolvente DMSO.

3. Se toman 50 µL de medio de cultivo de cada pozo y se agregan 50 µL del sustrato de la luciferasa y luego se someten a agitación tipo vórtice durante 10 minutos.

4. Se toman 80 µL de solución de reacción y se transfieren a una placa blanca de 96 pozos, luego se detectan en el lector de microplacas Invision (instrumento de medición de marcación con enzimas).

Los resultados experimentales: en comparación con los compuestos positivos para Liraglutida, la actividad del compuesto HS-20001 de la invención es aproximadamente igual a la de los compuestos positivos, pero el HS-20002-20008 muestra una actividad agonista mucho mejor.

5

Tabla 1. Valores de EC50 de la serie de compuestos:

Compuestos	EC50 (nM)	Ci del 95% (nM)	Velocidad máxima de reacción (%)
Liraglutida	0,014707	9,726e-012 a 2,223e-011	96,84616
HS-20001	0,013552	7,6757e-012 a 2,3963e-011	98,11013
HS-20002	0,0014145	1,2036e-012 a 1,6623e-012	87,99447
HS-20003	0,00071876	4,9657e-013 a 1,0404e-012	87,86082
HS-20004	0,00037259	2,1453e-013 a 6,4710e-013	90,81368
HS-20005	0,00023552	7,3567e-012 a 2,2346e-011	89,13468
HS-20006	0,00064358	1,3581e-012 a 1,4523e-012	87,4281
HS-20007	0,00054921	4,1354e-013 a 1,2514e-012	87,0389
HS-20008	0,00021002	2,2436e-013 a 6,0245e-013	88,4628

Ejemplo experimental 2: Prueba de la actividad *in vivo*

10 Los ratones db/db con diabetes tipo 2 se dividen en seis grupos según la glucosa en sangre aleatoria y el peso corporal (8 por grupo). Solución salina fisiológica, 3 o 10 µg/kg de nuevos compuestos de la serie HS (Liraglutida, 20001, 20002, 20003, 20004, 2005, 2006, 2007, 2008) se administran mediante inyección subcutánea única. La glucosa en sangre aleatoria de los ratones se determina en un momento diferente después de la administración.

15 Los sujetos animales utilizados en el experimento son ratones db/db, que son productos de una corporación estadounidense llamada Jackson y son conservados y reproducidos por el Instituto de Materia Médica de la Academia de Ciencias China de Shanghai, cuyo Certificado de Conformidad es: SCXK(HU)2008-0017, peso corporal: 35-50 g; Género: macho 85, hembra 86, criados en una sala de animales de grado SPF; Temperatura: 22-24°C; Humedad: 45-80%; Luz: 150-300 Lx, 12 h día se alterna con la noche.

20 Los fármacos de prueba del experimento son HS-20001, HS-20002, HS-20003, HS-20004, HS-20005, HS-20006, HS-20007, HS-20008, Liraglutida (desarrollados por Novo Nordisk, como control positivo).  
 Método de preparación: 1 botella del compuesto (2 mg/botella) se disuelve con agua doblemente destilada para preparar una solución incolora y transparente cuya concentración es 2 mg/mL, luego la solución se diluye a 0,6 µg/mL y 2 µg/mL con solución salina fisiológica (inyección de cloruro de sodio, Double-Crane Pharmaceutical Co., Ltd. Anhui, número de lote: 080728 6C). El medidor de glucosa en sangre "ACCU-CHEK® Advantage" de Roche se utiliza para determinar la glucosa en sangre.

Ajuste de la dosis y el grupo

30 Grupo de prueba 1:

Grupo de control: solución salina fisiológica

Grupo de Liraglutida de 3 µg/kg

35

Grupo de HS-20001: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20002: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20003: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20004: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20005: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20006: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20007: 3 µg/kg  
 Grupo de HS-20008: 3 µg/kg

40

45 Grupo de prueba 2:

Grupo de control: solución salina fisiológica.

50

Grupo de Liraglutida: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20001: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20002: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20003: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20004: 10 µg/kg

## ES 2 694 394 T3

Grupo de HS-20005: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20006: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20007: 10 µg/kg  
 Grupo de HS-20008: 10 µg/kg

5 Ruta y volumen de administración: dosis de inyección subcutánea única, el volumen de la dosis es de 5 mL/kg.

Método de prueba

10 Detección, agrupación y administración de ratones db/db con diabetes tipo 2

Grupo de prueba 1:

15 Los ratones 171 db/db (macho 85, hembra 86) se criaron en una jaula única después del destete, alimentados con una dieta alta en grasas. La glucosa aleatoria y en ayunas se mide después de que los ratones db/db tienen siete semanas de edad. Se seleccionan 80 ratones db/db que se enfermaron y se dividen en 10 grupos según la glucosa aleatoria en sangre, la glucosa en sangre en ayunas y el peso corporal de la siguiente manera: grupo de control modelo, grupos con Liraglutida - 3 µg/kg, grupo de HS-20001 - 3 µg/kg, grupo de HS-20002 - 3 µg/kg, grupo de HS-20003 - 3 µg/kg, grupo de HS-20004 - 3 µg/kg, grupo de HS-20005 - 3 µg/kg, grupo de HS-20006 - 3 µg/kg, grupo de HS-20007 - 3 µg/kg y grupo de HS-20008 - 3 µg/kg.

Grupo de prueba 2:

25 Se miden las glucosas aleatorias en sangre de ratones db/db. Se seleccionan 80 ratones db/db que se enfermaron y se dividen en 10 grupos según la glucosa aleatoria en sangre y el peso corporal de la siguiente manera: grupo de control modelo, grupo de Liraglutida - 10 µg/kg, grupo de HS-20001 - 10 µg/kg, grupo de HS 20002 - 10 µg/kg, grupo de HS-20003 - 10 µg/kg, grupo de HS-20004 - 10 µg/kg, grupo de HS-20005 - 10 µg/kg, grupo de HS-20006 - 10 µg/kg, grupo de HS-20007 - 10 µg/kg y grupo de HS-20008 - 10 µg/kg.

30 Cada grupo tiene 8 ratones, mitad macho y mitad hembra. Los animales de cada grupo se administran con los compuestos de ensayo o el control de disolvente, respectivamente, a través de una inyección subcutánea única. La glucosa en sangre aleatoria se determina a 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h después de la administración y se calcula la tasa de disminución de la glucosa en sangre:

35 Disminución de la glucosa en sangre = (glucosa en sangre del grupo de control - glucosa en sangre del grupo de tratamiento)/glucosa en sangre del grupo control \* 100%.

Los resultados experimentales

40 Prueba 1: Efecto de los nuevos compuestos de dosis bajas administrados mediante una dosis única en glucosa aleatoria en sangre de ratones db/db

45 Los resultados se pueden ver en la Tabla 2 y en la Tabla 3. Los ratones db/db se administran con 3 µg/kg de HS-20002, 20004, 20005, 20006, 20007 o 20008 a través de una inyección subcutánea única, después de una hora, los valores aleatorios de glucosa en sangre de dichos ratones disminuyen significativamente en comparación con los del grupo de control ( $P < 0,05$ ), las tasas de disminución son 24,51%, 15,00%, 14,00%, 14,25%, 13,98% y 13,90% respectivamente; después de 2 h y 4 h desde la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre mantienen un nivel más bajo y tienen una diferencia significativa con respecto a los del grupo de control ( $P < 0,05$ ); después de 8 horas de la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre no tienen diferencias significativas con respecto a los del grupo de control. Los ratones se administran con 3 µg/kg de HS-20003 mediante inyección subcutánea, después de una hora, los valores aleatorios de glucosa en sangre disminuyen significativamente en comparación con los del grupo de control ( $P < 0,05$ ), hasta el 17,33%, después de 2 h, 4 h y 8 h a partir de la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre no muestran diferencias significativas con respecto a los del grupo de control. Después de administración con 3 µg/kg de HS-20001 para ratones db/db a través de una sola inyección subcutánea, los valores aleatorios de glucosa en sangre disminuyeron un poco en comparación con los del grupo de control, pero no hubo diferencias significativas. Los valores de glucosa en sangre al azar del grupo de ratones administrados con Liraglutida no tienen una disminución significativa.

60 Tabla 2: Efecto de la administración de los nuevos compuestos (mmol/L,  $\bar{X} \pm s$ ,  $n = 8$ ) a través de una dosis única en la glucosa aleatoria en sangre de ratones db/db en el mismo día

grupos	Antes de administración	Tiempo después de la administración (h)			
		1	2	3	4
control	25,14 ± 1,09	23,66 ± 0,73	22,63 ± 0,97	22,00 ± 1,00	25,39 ± 1,08
Liraglutida - 3 µg/kg	25,11 ± 2,33	21,78 ± 2,31	23,15 ± 2,62	21,56 ± 1,37	23,93 ± 2,09
HS-20001 - 3 µg/kg	25,21 ± 1,44	20,34 ± 2,29	19,84 ± 1,76	20,74 ± 2,51	24,29 ± 1,60

HS-20002 - 3 µg/kg	25,25 ± 1,57	17,86 ± 1,90*	19,56 ± 0,90*	18,10 ± 0,79**	24,19 ± 1,79
HS-20003 - 3 µg/kg	25,16 ± 1,49	19,56 ± 1,19*	19,44 ± 1,48	19,63 ± 1,12	25,59 ± 1,05
HS-20004 - 3 µg/kg	25,11 ± 1,63	20,11 ± 1,28*	18,81 ± 1,50*	17,98 ± 1,38*	23,30 ± 1,47
HS-20005 - 3 µg/kg	25,21 ± 1,56	20,11 ± 1,19*	18,96 ± 1,50*	18,98 ± 1,48*	22,36 ± 1,67
HS-20006 - 3 µg/kg	25,11 ± 1,49	20,36 ± 1,25*	19,91 ± 1,70*	19,58 ± 1,54*	24,30 ± 1,50
HS-20007 - 3 µg/kg	25,16 ± 1,63	20,43 ± 1,19*	19,81 ± 1,610*	20,98 ± 2,38*	23,42 ± 1,38
HS-20008 - 3 µg/kg	25,11 ± 1,58	20,56 ± 1,30*	20,81 ± 1,70*	19,30 ± 2,02*	22,41 ± 1,51

\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, en comparación con los del grupo de control

Tabla 3: La tasa de disminución de la glucosa aleatoria en sangre (% , n = 8) de ratones db/db administrados con los nuevos compuestos a través de una dosis única en el mismo día

grupo	Tiempo después de administración (h)			
	1	2	4	8
Liraglutida - 3 µg/kg	7,98%	-2,32%	1,99%	5,76%
HS-20001 - 3 µg/kg	14,05%	12,32%	5,74%	4,33%
HS-20002 - 3 µg/kg	24,51%	13,54%	17,73%	4,73%
HS-20003 - 3 µg/kg	17,33%	14,09%	10,80%	11,03%
HS-20004 - 3 µg/kg	15,00%	16,85%	18,30%	8,22%
HS-20005 - 3 µg/kg	14,00%	12,87%	10,53%	8,02%
HS-20006 - 3 µg/kg	14,25%	13,12%	10,86%	8,14%
HS-20007 - 3 µg/kg	13,98%	11,85%	9,30%	6,54%
HS-20008 - 3 µg/kg	13,90%	11,62%	8,90%	6,25%

5 Prueba 2: Efecto de los nuevos compuestos de dosis altas administrados en una sola dosis sobre la glucosa aleatoria en sangre de ratones db/db

Los resultados se pueden observar en la Tabla 4 y en la Tabla 5. Se administró a los ratones db/db 10 µg/kg de HS-20002 a través de una inyección subcutánea única, después de una hora, los valores aleatorios de glucosa en sangre de los ratones disminuyeron significativamente en comparación con los del grupo control (P < 0,01); después de 2 h, 4 h y 8 h desde la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre mantienen un nivel más bajo, en donde los valores a las 4 h después de la administración son más evidentes, de los cuales la tasa de disminución es de hasta 40,67% y es significativamente diferente de la del grupo de control (P < 0,001), hasta 24 horas después de la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre siguen siendo significativamente más bajos que los del grupo de control. A los ratones se les administró 10 µg/kg de HS-20003 a través de una inyección subcutánea única, después de una hora, los valores aleatorios de glucosa en sangre disminuyeron significativamente en comparación con los del grupo de control (P < 0,01) y disminuyeron hasta un 23,62%, después de 2 h, 4 h y 8 h desde la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre aún se mantienen en un nivel más bajo, después de 24 horas desde la administración, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo de control. A los ratones db/db se les administró 10 µg/kg de HS-20001 a través de una sola inyección subcutánea; después de 2 h, los valores aleatorios de glucosa en sangre disminuyen significativamente en comparación con los del grupo de control, después de 4 h y 8 h desde la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre aún se mantienen en un nivel más bajo, después de 24 horas desde la administración, los valores aleatorios de glucosa en sangre no muestran diferencias significativas con respecto a los del grupo de control. HS-20002, HS-20004, HS-20005, HS-20006, HS-20007 o HS-20008 se administran a los ratones a través de una inyección subcutánea única y los valores aleatorios de glucosa en sangre disminuyen de forma inmediata y significativa, la tasa de disminución es de hasta 36,20%, 10 después de 2 h, después de 4 h y 8 h desde la administración, los valores de glucosa en sangre aún se mantienen en un nivel más bajo, después de 24 h desde la administración, no hay diferencia significativa en comparación con los del grupo control. Los valores de glucosa aleatoria en sangre de ratones del grupo administrado con Liraglutida no tienen una disminución significativa.

Tabla 4: Efecto de los nuevos compuestos administrados a través de una dosis única (mmol/L,  $\pm$  s, n = 8) en la glucosa aleatoria en sangre de ratones db/db en el mismo día

grupo	Tiempo después de la administración (h)					
	Antes de administración	1	2	4	8	24
control		27,15 $\pm$ 1,51	28,49 $\pm$ 1,58	30,76 $\pm$ 1,15	29,96 $\pm$ 0,88	27,75 $\pm$ 1,64
Liraglutida - 10 $\mu$ g/kg	23,08 $\pm$ 1,37	28,59 $\pm$ 1,501	28,89 $\pm$ 1,17	28,55 $\pm$ 1,31	31,84 $\pm$ 0,65	27,78 $\pm$ 1,14
HS-20001 - 10 $\mu$ g/kg	23,16 $\pm$ 1,57	23,90 $\pm$ 1,79	20,94 $\pm$ 1,57**	20,20 $\pm$ 1,78**	23,86 $\pm$ 1,87*	24,60 $\pm$ 1,92
HS-20002 - 10 $\mu$ g/kg	23,15 $\pm$ 1,32	19,74 $\pm$ 1,16**	20,31 $\pm$ 2,01**	18,25 $\pm$ 1,98**	22,55 $\pm$ 2,20**	22,60 $\pm$ 1,46*
HS-20003 - 10 $\mu$ g/kg	23,20 $\pm$ 1,36	20,74 $\pm$ 0,98**	21,10 $\pm$ 0,80**	19,54 $\pm$ 1,80**	22,14 $\pm$ 2,16**	24,45 $\pm$ 1,55
control		30,76 $\pm$ 1,15	30,29 $\pm$ 0,98	29,90 $\pm$ 0,89	31,04 $\pm$ 0,94	28,98 $\pm$ 1,62
HS-20004 - 10 $\mu$ g/kg	23,18 $\pm$ 1,65	19,63 $\pm$ 1,81***	21,86 $\pm$ 1,66***	21,44 $\pm$ 1,68**	23,80 $\pm$ 1,46***	25,64 $\pm$ 1,85
HS-20005 - 10 $\mu$ g/kg	23,64 $\pm$ 1,35	19,39 $\pm$ 1,61***	21,56 $\pm$ 1,56***	21,49 $\pm$ 1,34**	23,46 $\pm$ 1,51***	25,52 $\pm$ 1,68
HS-20006 - 10 $\mu$ g/kg	23,54 $\pm$ 1,39	19,52 $\pm$ 1,72***	21,43 $\pm$ 1,49***	21,53 $\pm$ 1,67**	23,39 $\pm$ 1,55***	25,59 $\pm$ 1,74
HS-20007 - 10 $\mu$ g/kg	23,56 $\pm$ 1,42	19,41 $\pm$ 1,54***	21,84 $\pm$ 1,57***	21,64 $\pm$ 1,56**	23,81 $\pm$ 1,67***	25,91 $\pm$ 1,53
HS-20008 - 10 $\mu$ g/kg	23,49 $\pm$ 1,49	19,38 $\pm$ 1,83***	21,61 $\pm$ 1,68***	21,72 $\pm$ 1,63**	23,56 $\pm$ 1,80***	25,72 $\pm$ 1,69

\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, en comparación con el grupo de control

Tabla 5: La tasa de disminución de la glucosa aleatoria en sangre (% , n = 8) de los ratones db/db administrados con los nuevos compuestos a través de una dosis única en el mismo día

grupo	Tiempo después de administración (h)				
	1	2	4	8	24
Liraglutida - 10 µg/kg	-5,29%	-1,40%	7,19%	-6,26%	-0,09%
HS-20001 - 10 µg/kg	11,97%	26,50%	34,34%	20,36%	11,35%
HS-20002 - 10 µg/kg	27,30%	28,71%	40,67%	24,74%	18,56%
HS-20003 - 10 µg/kg	23,62%	25,93%	36,49%	26,12%	11,89%
HS-20004 - 10 µg/kg	36,20%	27,82%	28,30%	23,32%	11,52%
HS-20005 - 10 µg/kg	37,58%	28,32%	29,12%	24,10%	12,46%
HS-20006 - 10 µg/kg	38,12%	27,66%	29,78%	23,72%	13,66%
HS-20007 - 10 µg/kg	36,72%	25,43%	26,54%	23,03%	12,16%
HS-20008 - 10 µg/kg	35,49%	25,79%	27,33%	22,57%	14,58%

Conclusión de las pruebas:

5 La glucosa aleatoria en sangre de ratones db/db administrados con series de los nuevos compuestos de la invención a través de una sola inyección subcutánea puede disminuir significativamente; la glucosa aleatoria en sangre puede disminuirse obviamente por HS-20002, HS-20003, HS-20004, HS-20005, HS-20006, HS-20007 y HS-20008 en una  
 10 dosis de 3 µg/kg. En donde, HS-20002 y HS-20004 muestran un efecto mucho mejor en la reducción de la glucosa aleatoria en sangre, la duración del efecto hipoglucémico después de la inyección subcutánea única está relacionada con la dosis, la duración del efecto de HS-20002 y HS-20004 en la disminución la glucosa aleatoria en sangre en la dosis de 3 µg/kg es más de 4 h, y la duración del efecto de HS-20001, HS-20002, HS-20003, HS-20004, HS-20005, HS-20006, HS-20007 y HS-20008 sobre la disminución de la glucosa aleatoria en sangre en la  
 15 dosis de 10 µg/kg es más de 8 h.

Listado de secuencias

<110> Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Group Co., Ltd.

20 <120> Derivado de un análogo del GLP-1 o sus sales farmacéuticas y sus usos

<130> 890086CG

<160> 120

25 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 42

30 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa representa D-Ala

<400> 1

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Asn Leu Glu  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Gln Gly Gly  
 20 25 30

Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

40 <210> 2

<211> 40

<212> PRT

45 <213> artificial

ES 2 694 394 T3

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

5

<210> 3  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> artificial

10

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa representa D-Ala

15

<400> 3

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

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

20

<210> 4  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> artificial

25

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa representa Aib

30

<400> 4

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

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

35

<210> 5  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

ES 2 694 394 T3

<400> 5

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 6  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

15 <400> 6

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20 <210> 7  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

25 <400> 7

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

30 <210> 8  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

35 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

<400> 8

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 9  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

15 <400> 9

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

20 <210> 10  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35 <210> 11  
 <211> 39

ES 2 694 394 T3

<212> PRT  
<213> artificial

<400> 11

5

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10 <210> 12  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <400> 12

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20 <210> 13  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

25 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

30 <400> 13

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35 <210> 14  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>

ES 2 694 394 T3

<221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

5 <400> 14

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

10 <210> 15  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

25 <400> 15

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

30 <210> 16  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 16

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30  
 Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35 <210> 17  
 <211> 39  
 <212> PRT

ES 2 694 394 T3

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

5 <222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

<400> 17

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10

<210> 18

<211> 39

15 <212> PRT

<213> artificial

<400> 18

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 19

<211> 39

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

30

<400> 19

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial



ES 2 694 394 T3

<212> PRT  
<213> artificial

<220>

5 <221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

<400> 23

10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

<210> 24

<211> 39

15 <212> PRT  
<213> artificial

<400> 24

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

30 <223> Xaa representa Sar

<400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

ES 2 694 394 T3

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

5 <222> (16)..(16)

<223> Xaa representa Aib

<400> 26

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10

<210> 27

<211> 39

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<221> características\_misc

<222> (16)..(16)

20 <223> Xaa representa Aib

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

25 <223> Xaa representa Sar

<400> 27

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

30

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

35

<400> 28

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 29  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 10 <223> Xaa representa Sar

<400> 29

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 30  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <400> 30

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

25 <210> 31  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

35 <400> 31

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

ES 2 694 394 T3

<210> 32  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib  
 10  
 <400> 32  
  
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30  
  
 Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35  
 15  
 <210> 33  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20  
 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib  
 25  
 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar  
 30  
 <400> 33  
  
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30  
  
 Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35  
 35  
 <210> 34  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <400> 34  
 40

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

<210> 35  
<211> 39  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
10 <221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

<400> 35

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

15 <210> 36  
<211> 39  
<212> PRT  
20 <213> artificial

<400> 36

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25 <210> 37  
<211> 39  
<212> PRT  
30 <213> artificial

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

35 <400> 37

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 38  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 38  
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 39  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

25 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

30 <400> 39

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35 <210> 40  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

ES 2 694 394 T3

<400> 40

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5

<210> 41  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10

<220>  
<221> características\_misc

15

<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

<400> 41

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 42  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

25

<400> 42

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

30

<210> 43  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

35

<220>  
<221> características\_misc

ES 2 694 394 T3

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

<400> 43

5

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

<210> 44

<211> 39

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

15

<222> (16)..(16)

<223> Xaa representa Aib

<400> 44

20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

<210> 45

<211> 39

25

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

30

<222> (16)..(16)

<223> Xaa representa Aib

<220>

<221> características\_misc

35

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

<400> 45

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 46  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<400> 46

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10  
  
15 <210> 47  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
20 <223> Xaa representa Sar  
  
<400> 47

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25  
  
30 <210> 48  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<400> 48

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 49  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 49

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 50  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 50

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

30 <210> 51  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

ES 2 694 394 T3

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

5 <223> Xaa representa Sar

<400> 51

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10

<210> 52

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

15

<400> 52

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 53

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

30

<400> 53

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35

<210> 54

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

40

<400> 54

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 55  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 55

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 56  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 56

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

30 <210> 57  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

ES 2 694 394 T3

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

5 <223> Xaa representa Sar

<400> 57

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10

<210> 58

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

15

<400> 58

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 59

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

<400> 59

30

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35

<210> 60

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

<400> 60

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 61  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

<400> 61

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

15 <210> 62  
<211> 39  
<212> PRT  
20 <213> artificial

<400> 62

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25 <210> 63  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

35 <400> 63

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 64  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 64

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10 <210> 65  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

20 <400> 65

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25 <210> 66  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <400> 66

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

<210> 67  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

10

<400> 67

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

<210> 68  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15

<400> 68

20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

<210> 69  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

30

<400> 69

35

ES 2 694 394 T3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 70  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

<400> 70

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10 <210> 71  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

20 <400> 71

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25 <210> 72  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <400> 72

ES 2 694 394 T3

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 73  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 73  
 His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 74  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <400> 74

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

25 <210> 75  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

35 <400> 75

ES 2 694 394 T3

His Leu Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 76  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa representa Aib

<400> 76  
His Leu Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

15 <210> 77  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa representa Aib

25 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

30 <400> 77

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35 <210> 78  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

ES 2 694 394 T3

<400> 78

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5

<210> 79  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

15

<400> 79

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

20

<210> 80  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25

<400> 80

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

30

<210> 81  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 81

ES 2 694 394 T3

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 82  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

15 <400> 82

His Leu Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

20 <210> 83  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Aib

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 83

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

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35



ES 2 694 394 T3

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 87  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 87

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

10 <210> 88  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

20 <400> 88

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

25 <210> 89  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

35 <400> 89

ES 2 694 394 T3

His Leu Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 90  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

15 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 90

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

20 <210> 91  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<400> 91

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

30 <210> 92  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

ES 2 694 394 T3

<400> 92

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5

<210> 93  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10

<400> 93

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

15

<210> 94  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

20

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

25

<400> 94

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

30

<210> 95  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

35

<220>  
<221> características\_misc  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa representa Aib

ES 2 694 394 T3

<400> 95

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

5 <210> 96  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa representa Aib

15 <220>  
<221> características\_misc  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa representa Sar

20 <400> 96

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

25 <210> 97  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

30 <400> 97

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35 <210> 98  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>

ES 2 694 394 T3

<221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

5 <400> 98

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

<210> 99  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<400> 99

15

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

<210> 100  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

25

<400> 100

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

30

<210> 101  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35

<220>  
 <221> características\_misc

ES 2 694 394 T3

<222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 101

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5

<210> 102  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

15

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

20

<400> 102

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

25

<210> 103  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30

<400> 103

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35

<210> 104  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

ES 2 694 394 T3

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

5 <223> Xaa representa Sar

<400> 104

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

10

<210> 105

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

15

<400> 105

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

<210> 106

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<221> características\_misc

<222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

30

<400> 106

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Met Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

35

<210> 107

<211> 39

<212> PRT

<213> artificial



ES 2 694 394 T3

<210> 110  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

10

<400> 110

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 111  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <400> 111

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

25 <210> 112  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Aib

35 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

40 <400> 112

ES 2 694 394 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

<210> 113  
 <211> 39  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <221> características\_misc  
 10 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 113

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 114  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 20 <213> artificial

<220>  
 <221> características\_misc  
 25 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Aib

<220>  
 <221> características\_misc  
 30 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<220>  
 <221> características\_misc  
 35 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 114

ES 2 694 394 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Leu Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 115  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <400> 115

His Ile Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Gly  
 1 5 10 15

10 Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

15 <210> 116  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Aib

25 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

30 <400> 116

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35 <210> 117  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <400> 117

40

ES 2 694 394 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

5 <210> 118  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Aib

15 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (34)..(34)  
 <223> Xaa representa Sar

<400> 118

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

20 <210> 119  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

30 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa representa Aib

<400> 119

His Lys Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gly Gly Pro Pro Pro Ser Lys  
 35

35 <210> 120  
 <211> 39  
 <212> PRT

ES 2 694 394 T3

<213> artificial

<220>

<221> características\_misc

5 <222> (2)..(2)

<223> Xaa representa Aib

<220>

<221> características\_misc

10 <222> (16)..(16)

<223> Xaa representa Aib

<220>

<221> características\_misc

15 <222> (34)..(34)

<223> Xaa representa Sar

<400> 120

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Gln Met Glu Xaa  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Glu Phe Ile Val Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys Lys  
20 25 30

Gly Xaa Pro Pro Pro Ser Lys  
35

20

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho análogo del GLP-1 se selecciona de:

5 His-(D)-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Nle-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Gln-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys;

His-(D)-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.3);

His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.4);

10 His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.5);

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Sar-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.6);

15 His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.7); y

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Glu-Phe-Ile-Val-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Lys-Gly-Sar-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (SEQ ID No.8),

20 en el que el derivado de dicho análogo del GLP-1 contiene un sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$ , en el que  $R_1$  se selecciona de  $CH_3$  y  $HOOC-$ ,  $n$  es un número entero seleccionado de 8-25, en donde el sustituyente lipofílico de fórmula  $R_1(CH_2)_n-CO-$  y el grupo amino  $\alpha$  del Lys C-terminal del análogo del GLP-1 están unidos por un enlace amida.

25 2. Los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1, en los que  $R_1$  es  $CH_3-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22.

3. Los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 2, en los que  $R_1$  es  $CH_3-$  y  $n$  es 14.

30 4. Los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1, en donde  $R_1$  es  $HOOC-$ , y  $n$  es un número entero seleccionado de 14, 16, 18, 20 y 22.

35 5. Los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 4, en los que  $R_1$  es  $HOOC-$ , y  $n$  es 14.

6. El derivado del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del análogo del GLP-1 es la SEQ ID NO: 4.

40 7. Una composición farmacéutica que comprende:

- (1) una cantidad terapéuticamente eficaz de los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y
- (2) un excipiente o portador del fármaco farmacéuticamente aceptable.

8. Uso de los derivados del análogo del GLP-1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina, diabetes insulino dependiente u obesidad.