

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 945**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2012 E 16195214 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3225631**

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

30 Prioridad:

12.04.2011 EP 11162087

13.04.2011 US 201161474913 P

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

16.05.2019

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

KOFOED, JACOB;

LINDEROTH, LARS;

KRUSE, THOMAS;

SPETZLER, JANE y

WIEZOREK, BIRGIT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 712 945 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).

enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- β , y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.

5 La invención se refiere, además, a productos intermedios en la forma de análogos de GLP-1 novedosos, que son relevantes para la preparación de determinados derivados de la invención.

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

Descripción

15 En la presente, las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etcétera. Además, la letra griega de μ puede representarse por "u", por ejemplo en μ l=uL, o en μ M=uM.

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

Análogos de GLP-1

25 El término "análogo de GLP-1" o "análogo de GLP-1" como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido, o a un compuesto, que es una variante del Péptido tipo Glucagón-1 humano (GLP-1(7-37)), la secuencia del cual se incluye en el listado de secuencias como la sec. con núm. de ident.: 1. El péptido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1 también puede designarse como GLP-1 nativo.

30 En el listado de secuencias, el primer residuo aminoacídico de la sec. con núm. de ident.: 1 (histidina) se asigna como núm. 1. Sin embargo, en lo que sigue - de acuerdo con la práctica establecida en la técnica - este residuo de histidina se denomina como núm. 7 y los residuos aminoacídicos posteriores se enumeran en consecuencia, terminando con glicina núm. 37. Por lo tanto, generalmente, cualquier referencia en la presente descripción al número del residuo de aminoácido o un número de posición de la secuencia de GLP-1(7-37) es a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y termina con Gly en la posición 37.

35 Los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención pueden describirse como referencia i) al número del residuo aminoacídico en el GLP-1(7-37) nativo correspondiente al residuo aminoacídico que se cambia (es decir, la posición correspondiente en el GLP-1 nativo) y ii) al cambio real. Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura apropiada de los análogos:

40 Un ejemplo no limitante de un análogo de GLP-1 es un análogo que se cambia de manera que comprende un primer residuo de lisina en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37), y un segundo residuo de lisina en la posición 12. La secuencia aminoacídica de este análogo es de cualquier otra manera idéntica a la de GLP-1 nativo, y este análogo puede designarse como K¹², K²⁷-GLP-1(7-37). Esta designación representa la secuencia de aminoácidos del GLP-1 nativo donde la fenilalanina en la posición 12 se ha sustituido con lisina, y el ácido glutámico en la posición 27 se ha sustituido con lisina.

50 El análogo de GLP-1 que forma parte del derivado de la invención comprende un máximo de diez cambios de aminoácidos cuando se compara con el GLP-1(7-37) nativo (sec. con núm. de ident.: 1). En otras palabras, es un péptido de GLP-1(7-37) en el cual se han cambiado un número de residuos de aminoácidos cuando se compara con el GLP-1(7-37) nativo (sec. con núm. de ident.: 1). Estos cambios pueden representar, independientemente, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

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

55 Por ejemplo, el análogo [Aib8,Lys22,Val25,Arg26,Lys27,His31,Arg34]-GLP-1-(7-37) designa un péptido GLP-1(7-37) que, cuando se compara con GLP-1 nativo, tiene las siguientes sustituciones: Sustitución de alanina en la posición 8 con Aib (ácido α -aminoisobutírico), de glicina en la posición 22 con lisina, de alanina en la posición 25 con valina, de lisina en la posición 26 con arginina, de ácido glutámico en la posición 27 con lisina, de triptófano en la posición 31 con histidina, y de lisina en la posición 34 con arginina. Este análogo también puede designarse brevemente como (8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R).

65 Como otro ejemplo, el análogo [Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Lys27,Glu30,Gly34]-GLP-1-(7-34) designa un péptido GLP-1(7-37), que, cuando se compara con GLP-1 nativo, está cambiado por la sustitución de alanina en la posición 8 con Aib, la sustitución de leucina en la posición 20 con lisina, la sustitución de glicina en la posición 22 con ácido glutámico, la sustitución de lisina en la posición 26 con arginina, la sustitución de ácido glutámico en la posición 27 con lisina, la sustitución de alanina en la posición 30 con ácido glutámico, la sustitución de lisina en la posición 34 con glicina, y por

ES 2 712 945 T3

la delección del extremo C terminal de glicina-arginina-glicina en la posición 35-36-37. Este análogo también puede designarse brevemente como (8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37), donde la referencia a GLP-1(7-37) está implicada y "des" representa una delección.

5 Aún como otro ejemplo, un análogo que comprende Glu³⁸ y Gly³⁹ se refiere a un péptido GLP-1(7-37), que, cuando se compara con GLP-1 nativo, comprende una adición del dipéptido de (ácido glutámico - glicina) al extremo C-terminal de GLP-1(7-37). Además puede decirse brevemente que este análogo comprende (38E, 39G), donde la referencia a GLP-1(7-37) está implícita.

10 Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, cuando se comparan con la sec. con núm. de ident.: 1. Un ejemplo, no limitante, de un análogo que comprende (38E, 39G) es la parte del péptido del Químico 51.

15 Como es evidente a partir de los ejemplos anteriores, los residuos de aminoácidos pueden identificarse mediante su nombre completo, su código de una letra, y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son totalmente equivalentes.

20 Las expresiones "una posición equivalente a" o "posición correspondiente" puede usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia de GLP-1(7-37) como referencia a GLP-1(7-37) nativo (sec. con núm. de ident.: 1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como la cantidad de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo mediante simple escritura e inspección visual; y/o puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "align" que es una alineación de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453 y el programa de alineaciones descrito por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. Para el alineamiento, puede usarse la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 y la matriz de identidad predeterminada, y la penalización para el primer residuo en una interrupción puede fijarse en -12 o preferentemente en -10 y las penalizaciones para residuos adicionales en una interrupción en -2 o preferentemente en -0,5.

30 Un ejemplo de tal alineamiento se inserta a continuación, en cuya secuencia núm. 1 (sec. con núm. de ident.1) es la sec. con núm. de ident.: 1 y la secuencia núm. 2 (Análogo) es el análogo (22K, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37) de esta:

Secuencias alineadas: 2

35 # 1: Sec. con núm. de ident.:1

2: ANÁLOGO

Matriz: EBLOSUM62

40 # Penalización_interrupción: 10,0

Penalización_extendida: 0,5

45 #

Longitud: 31

Identidad: 23/31 (74,2 %)

50 # Similitud: 25/31 (80,6%)

Interrupciones: 3/31 (9,7 %)

55 # Puntuación: 117,0

#

60 Sec. con núm. de ident.1

1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG 31

|||||.|.:|.|||.

ANÁLOGO

1 HAEGTFTSDVSSYLEKQAARKFIEWLVG--- 28

65 En el caso de los aminoácidos no naturales tales como Aib que se incluyen en la secuencia, pueden reemplazarse, para propósitos de alineamiento, con X. Si es conveniente, X puede corregirse después manualmente.

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

5 Los péptidos de la invención comprenden al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados mediante enlaces peptídicos. En modalidades particulares el péptido comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, con mayor preferencia al menos 20, incluso con mayor preferencia al menos 25, o con la máxima preferencia al menos 28 aminoácidos.

10 En modalidades particulares, el péptido está compuesto de al menos cinco aminoácidos constituyentes, preferentemente compuesto por al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o con la máxima preferencia compuesto de al menos 28 aminoácidos.

15 En otras modalidades particulares, el péptido a) está compuesto de, o b) consiste en, i) 28, ii) 29, iii) 30, iv) 31, v) 32, o vi) 33 aminoácidos.

En aún una modalidad particular, el péptido consiste en aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

20 Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amina y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, frecuentemente referidos como una cadena lateral.

25 El término "aminoácido" incluye aminoácidos proteogénicos (codificado por el código genético, que incluye aminoácidos naturales y aminoácidos estándar), así como también aminoácidos no proteogénicos (no encontrado en proteínas, y/o no codificado por el código genético estándar) y sintéticos. Por lo tanto, los aminoácidos pueden seleccionarse del grupo de aminoácidos proteogénicos, aminoácidos no proteogénicos, y/o aminoácidos sintéticos.

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

35 En la presente, todos los aminoácidos para los cuales no se indica el isómero óptico debe entenderse que significa el isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

40 Los derivados de GLP-1 y los análogos de la invención tienen actividad de GLP-1. Este término se refiere a la capacidad de unirse al receptor de GLP-1 e iniciar una vía de transducción de señales que da como resultado la acción insulínica u otros efectos fisiológicos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los análogos y derivados de la invención pueden analizarse para determinar la actividad de GLP-1 mediante el uso del ensayo descrito en el ejemplo 33 en la presente descripción. El ensayo de unión al receptor de GLP-1 descrito en el ejemplo 34 en la presente puede usarse, además, para determinar la actividad de GLP-1 (el experimento de HSA baja).

Derivados de GLP-1

45 El término "derivado" como se usa en la presente descripción en el contexto de un péptido GLP-1 o análogo significa un péptido GLP-1 o análogo modificado químicamente, en el que uno o más sustituyentes se han unido covalentemente al péptido. El sustituyente puede referirse, además, a una cadena lateral.

50 En una modalidad particular, la cadena lateral es capaz de formar agregados no covalentes con albúmina, lo que promueve de esta manera la circulación del derivado con la corriente sanguínea y tienen además el efecto de proteger el tiempo de acción del derivado, debido al hecho de que el agregado del derivado de GLP-1 y la albúmina se desintegra sólo lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo. Por lo tanto, el sustituyente, o la cadena lateral como un todo es, preferentemente, referido como una porción de unión a albúmina.

55 En otra modalidad particular la porción de unión a albúmina comprende una porción que es particularmente relevante para la unión a albúmina y de esta manera la protección, cuya porción puede referirse a una porción de prolongación. La porción de prolongación puede estar en, o cerca, del extremo opuesto de la porción de unión a albúmina, en relación con su punto de unión al péptido.

60 Aún en una modalidad particular adicional la porción de unión a albúmina comprende una porción entre la porción de prolongación y el punto de unión al péptido, cuya porción puede referirse a un conector, una porción de conector, un espaciador o similares. El enlazador puede ser opcional y, por lo tanto, en ese caso la porción de unión a albúmina puede ser idéntica a la porción de prolongación.

65 En modalidades particulares, la porción de unión a albúmina y/o la porción de prolongación es lipófila, y/o cargada negativamente a pH fisiológico (7,4).

La porción de unión a albúmina, la porción de prolongación, o el conector puede unirse covalentemente a un residuo de lisina del péptido GLP-1 mediante acilación.

5 En una modalidad preferida, un éster activo de la porción de unión a albúmina, preferentemente que comprende una porción de prolongación y un conector, se une covalentemente a un grupo amino de un residuo de lisina, preferentemente el grupo épsilon amino de este, bajo la formación de un enlace amida (este proceso que se refiere como acilación).

10 A menos que se establezca de cualquier otra manera, cuando se hace referencia a una acilación de un residuo de lisina, se entiende que se trata del grupo épsilon amino del mismo.

15 Un derivado que comprende dos porciones de prolongación unidas a un residuo K primero y segundo (por ejemplo, a K²⁷ y K^T) mediante un conector puede referirse a un derivado que se ha acilado dos veces, acilado doble, o doble acilado a los grupos épsilon amino de los residuos de lisina primero y segundo, por ejemplo en la posición 27 y T, respectivamente, del péptido GLP-1.

20 Para los propósitos presentes, los términos "porción de unión a albúmina", "porción de prolongación" y "enlazador" pueden incluir las formas sin reaccionar, así como también las formas que reaccionaron de estas moléculas. Si se quiere decir o no una forma u otra es claro a partir del contexto en el que se usa el término.

En un aspecto, cada porción de prolongación comprende, o consiste en, una porción de prolongación, seleccionada independientemente del Químico 1 y el Químico 2:

25 Químico 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}^*$

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

en donde x es un número entero en el intervalo de 6-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 3-17.

30 En una modalidad, $^*-(\text{CH}_2)_x^*$ se refiere a alquileo lineal o ramificado, preferentemente lineal, en el cual x es un número entero en el intervalo de 6-16.

35 En otra modalidad, $^*-(\text{CH}_2)_y^*$ se refiere a alquileo lineal o ramificado, preferentemente lineal, en el cual y es un número entero en el intervalo de 3-17.

El término "ácido graso" se refiere a ácidos monocarboxílicos alifáticos que tienen de 4 a 28 átomos de carbono, es preferentemente no ramificado, y/o incluso enumerados, y puede ser saturado o insaturado.

40 El término "diácido graso" se refiere a ácidos grasos como se definió anteriormente, pero con un grupo ácido carboxílico adicional en la posición omega. Por lo tanto, los diácidos grasos son ácidos dicarboxílicos.

45 La nomenclatura es como es común en la técnica, por ejemplo en las fórmulas anteriores $^*-\text{COOH}$ así como HOOC^* se refiere a carboxi, $^*-\text{C}_6\text{H}_4^*$ a fenileno y $^*-\text{CO}^*$ así como $^*-\text{OC}^*$ a carbonilo ($\text{O}=\text{C}^*-\text{}$); $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}^*$ a fenoxilo. En modalidades particulares, los aromáticos, tales como los radicales fenoxilo y fenileno, pueden ser, independientemente, orto, meta o para.

Como se explicó anteriormente, los derivados de GLP-1 de la presente invención son doblemente acilados, es decir dos porciones de unión a albúmina se unen covalentemente al péptido GLP-1.

50 En una modalidad particular, las dos porciones de unión a albúmina (es decir las cadenas laterales completas) son similares, preferentemente sustancialmente idénticas, o, con la máxima preferencia, idénticas.

55 En otra modalidad particular, las dos porciones de prolongación, son similares, preferentemente sustancialmente idénticas, o, con la máxima preferencia, idénticas.

Aún en modalidades particulares adicionales, los dos conectores son similares, preferentemente sustancialmente idénticos o con la máxima preferencia idénticos.

60 El término "sustancialmente idénticos" incluye diferencias de identidad que son debidas a la formación de una o más sales, ésteres, y/o amidas; preferentemente la formación de una o más sales, ésteres de metilo y amidas simples; con mayor preferencia la formación de no más de dos sales, ésteres de metilo, y/o amidas simples; incluso con mayor preferencia la formación de no más de una sal, éster de metilo, y/o amida simple; o con la máxima preferencia la formación de no más de una sal.

65 En el contexto de los compuestos químicos tales como porciones de unión a albúmina, porciones de prolongación y conectores, la similitud y/o identidad pueden determinarse mediante el uso de cualquier programa informático adecuado y/o algoritmo conocido en la técnica.

Por ejemplo, la similitud de dos porciones de prolongación, dos conectores, y/o dos cadenas laterales completas puede determinarse adecuadamente mediante el uso de huellas moleculares. Las huellas es un método matemático para representar una estructura química (ver por ejemplo Chemoinformatics: A textbook, Johann Gasteiger y Thomas Engel (Eds), Wiley-VCH Verlag, 2003).

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

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

El coeficiente de Tanimoto se usa preferentemente para calcular la similitud de las dos huellas, se usa ya sea a), b), o c).

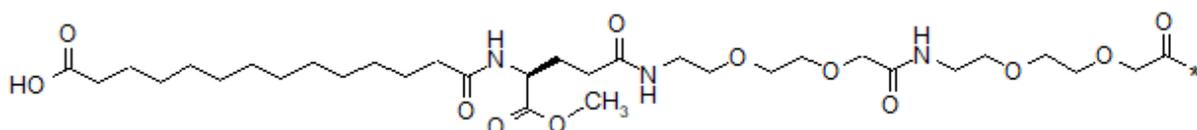
En modalidades particulares, se usa ya sea a), b) o c), las dos porciones de prolongación, los dos conectores, y/o las dos cadenas laterales completas, respectivamente, tienen una similitud de al menos 0,5 (50 %); preferentemente al menos 0,6 (60 %); con mayor preferencia al menos 0,7 (70 %), o al menos 0,8 (80 %); incluso con mayor preferencia al menos 0,9 (90 %); o con la máxima preferencia al menos 0,99 (99 %), tal como una similitud de 1,0 (100 %).

Las huellas UNITY pueden calcularse mediante el uso del programa SYBYL (disponible de Tripos, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319 Estados Unidos). Las huellas ECFP_6 y MDL pueden calcularse mediante el uso del programa Pipeline Pilot (disponible de Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, Estados Unidos).

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

A continuación se inserta un ejemplo de un cálculo de similitud, en el que la cadena lateral completa del Químico 66 se comparó con un éster metílico de este, concretamente, el éster monometílico de la porción enlazadora de glutamina (Químico 66a):

Químico 66a:



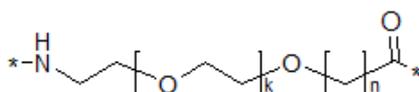
Mediante el uso de a) las huellas ECFP_6 la similitud es 0,798, mediante el uso de b) las huellas UNITY la similitud es 0,957; y mediante el uso de las huellas MDL la similitud es 0,905.

En el caso de dos cadenas laterales idénticas (porciones de unión a albúmina) el derivado puede designarse como simétrico.

En modalidades particulares el coeficiente de similitud es al menos 0,80, preferentemente al menos 0,85, con mayor preferencia al menos 0,90, aún con mayor preferencia al menos 0,95, o con la máxima preferencia al menos 0,99.

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

Químico 5:



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

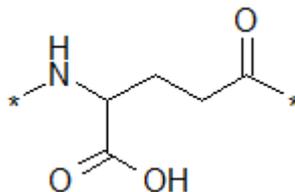
En una modalidad particular, cuando k=1 y n=1, este elemento enlazador puede designarse como OEG, o un dirradical del ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico, y/o puede representarse por la siguiente fórmula:

Químico 5a:

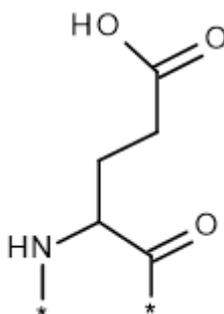


En otra modalidad particular, cada enlazador del derivado de la invención puede comprender, independientemente, un segundo elemento enlazador, preferentemente un dirradical Glu, tal como el Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:



Químico 7:



en donde el dirradical Glu puede incluirse p veces, donde p es un número entero en el intervalo de 1-2.

Químico 6 puede ser referido, además, como un gamma-Glu, o brevemente gGlu, debido al hecho de que este es el grupo gamma carboxilo del aminoácido ácido glutámico que se usa aquí para la conexión a otro elemento enlazador, o al grupo épsilon amino de lisina. Como se explicó anteriormente, el otro elemento enlazador puede ser, por ejemplo, otro residuo Glu, o una molécula OEG. El grupo amino de Glu, a su vez, puede formar un enlace amida con el grupo carboxilo de la porción de prolongación, o con el grupo carboxilo de, por ejemplo, una molécula de OEG, si está presente, o con el grupo gamma carboxilo de, por ejemplo, otro Glu, si está presente.

Químico 7 puede ser referido, además, como un alfa-Glu, o brevemente aGlu, o simplemente Glu, debido al hecho de que este es el grupo alfa carboxilo del aminoácido ácido glutámico que se usa aquí para la conexión a otro elemento enlazador, o al grupo épsilon amino de lisina.

Las estructuras anteriores del Químico 6 y el Químico 7 cubren la forma L, así como también la forma D del Glu.

Los derivados de la invención pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas que tienen la misma fórmula molecular y la secuencia de átomos unidos, pero que difieren solo en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. El estereoisomerismo de los derivados ejemplificados de la invención se indica en la sección experimental, en los nombres así como también las estructuras, mediante el uso de la nomenclatura estándar. A menos que se establezca de cualquier otra manera la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas del derivado reivindicado.

La concentración plasmática de los derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse mediante el uso de cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse LC-MS (Espectroscopía de Masas acoplada a Cromatografía Líquida), o inmunoensayos tales como RIA (Radio Inmuno Ensayo), ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzimas) y LOCI (Inmunoensayo de Canalización de Oxígeno de Luminiscencia). Los protocolos generales para ensayos RIA y ELISA adecuados se encuentran en, por ejemplo, el documento WO09/030738 en las páginas 116-118. Un ensayo preferido es el ensayo LOCI descrito en el Ejemplo 35, 39, y 40 en la presente descripción.

Sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable

Los derivados y análogos de la invención pueden estar en la forma de una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables.

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

5 La sal puede ser una sal básica, una sal ácida, o puede ser otro tipo de sal (es decir una sal neutra). Las sales básicas producen iones hidróxido y las sales ácidas iones hidronio en agua.

10 Las sales de los derivados de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos que reaccionan con grupos aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos grupos pueden ubicarse en la porción peptídica, y/o en la cadena lateral de los derivados de la invención.

15 Los ejemplos no limitantes de los grupos aniónicos de los derivados de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en la cadena lateral, si los hay, así como también en la porción peptídica. La porción peptídica frecuentemente incluye un grupo de ácido carboxílico libre en el C-terminal y puede incluir, además, grupos carboxílicos libres en los residuos aminoácidos tales como Asp y Glu.

20 Los ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en la porción peptídica incluyen el grupo amino libre en el N-terminal, si está presente, así como también cualquier grupo amino libre de residuos aminoácidos básicos internos tales como His, Arg y Lys.

25 El éster de los derivados de la invención pueden formarse, por ejemplo, mediante la reacción de un grupo de ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que conduce a reemplazo de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi.

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

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

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

45 En una modalidad particular, el péptido o derivado está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad particular, el derivado está en la forma de una amida farmacéuticamente aceptable, preferentemente con un grupo amida en el C-terminal del péptido. Aún en una modalidad particular adicional, el péptido o derivado está en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable.

40 Productos Intermedios

En un segundo aspecto, la invención se refiere a productos intermedios.

45 Un tipo de producto intermedio de la invención toma la forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 38Q; y/o (ii) 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

50 Otro producto intermedio de la invención en la forma de un análogo de GLP-1 es un análogo que comprende, preferentemente que tiene, los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xviii) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ix) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; o (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de este.

60 Propiedades funcionales

65 En un primer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen una buena potencia. Además, o alternativamente, en un segundo aspecto funcional, tienen un perfil farmacocinético prolongado. Además, o alternativamente, en un

tercer aspecto funcional, tienen una alta biodisponibilidad oral. Además, o alternativamente, en un cuarto aspecto funcional, sus propiedades biofísicas se mejoran.

Actividad biológica (potencia)

5 De acuerdo con el primer aspecto funcional, los derivados de la invención, así como también los péptidos GLP-1 constituyentes como tal son biológicamente activos o potentes.

10 En una modalidad particular, potencia y/o actividad se refiere a la potencia in vitro, es decir rendimiento en un ensayo de receptor de GLP-1 funcional, más en particular a la capacidad de estimular la formación de cAMP en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado.

15 La estimulación de la formación de cAMP en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano puede determinarse preferentemente mediante el uso de una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13) y/o mediante el uso de para la determinación de cAMP de un ensayo de receptor funcional, por ejemplo, basado en la competencia entre cAMP formado endógenamente y cAMP marcado con biotina añadido exógenamente, en el que el cAMP del ensayo se captura con mayor preferencia mediante el uso de un anticuerpo específico y/o en donde un ensayo incluso más preferido es el Ensayo de cAMP AlphaScreen, con la máxima preferencia el descrito en el Ejemplo 33.

20 El término concentración media eficaz máxima (EC₅₀) generalmente se refiere a la concentración que induce una respuesta media entre la línea de base y el máximo, como referencia a la curva de respuesta a dosis. EC₅₀ se usa como una medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración donde se observa el 50 % de su efecto máximo.

25 La potencia in vitro de los derivados de la invención puede determinarse como se describió anteriormente y determinarse la EC₅₀ del derivado en cuestión. A menor EC₅₀, mejor la potencia.

30 Un medio adecuado tiene la siguiente composición (concentraciones finales en el ensayo): TRIS-HCl 50 mM; HEPES 5 mM; MgCl₂, 6H₂O 10 mM; NaCl 150 mM; Tween al 0,01 %; BSA al 0,1 %; IBMX 0,5 mM; ATP 1 mM; GTP 1 μM; pH 7,4.

35 La EC₅₀ de los derivados de la invención es de 3500 pM o está por debajo de este valor, preferentemente de 3200 o por debajo de este valor. La EC₅₀ puede incluso estar por debajo de 1200 pM, preferentemente por debajo de 1000 pM, aún con mayor preferencia por debajo de 500 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 200 pM.

40 En otra modalidad particular del primer aspecto funcional, la potencia y/o actividad se refiere a la capacidad de unión al receptor de GLP-1 a una baja concentración de albúmina. La unión al receptor de GLP-1 a baja concentración de albúmina debería ser tan buena como sea posible, correspondiente a un bajo valor de IC₅₀. Esto puede determinarse como se describe en el Ejemplo 35. La IC₅₀ (albúmina baja) de los derivados de la invención es de 500 nM o por debajo de este valor, para muchos está por debajo de 100 nM, o incluso por debajo de 10 nM.

45 En otra modalidad particular los derivados de la invención son potentes in vivo, los que pueden determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como también en ensayos clínicos.

El ratón db/db diabético es un ejemplo de un modelo animal adecuado y el efecto de disminución de glucosa en sangre pueden determinarse en tales ratones in vivo, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 36, o como se describe en el Ejemplo 43 de WO09/030738.

50 Además, o alternativamente, el efecto sobre la ingesta de alimentos in vivo puede determinarse en estudios farmacodinámicos en cerdos, por ejemplo como se describe en el ejemplo 38.

Prolongación - unión al receptor / albúmina baja y alta

55 De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los derivados de la invención se prolongan.

Unión al receptor de GLP-1

60 En una modalidad particular "prolongación" se refiere a la capacidad de los derivados de la invención de unirse al receptor de GLP-1 en presencia de una concentración de albúmina baja y una alta, respectivamente, lo que puede determinarse como se describe en el ejemplo 34.

65 Generalmente, la unión al receptor de GLP-1 a baja concentración de albúmina debería ser tan buena como sea posible, correspondiente a un bajo valor de IC₅₀. En una modalidad albúmina baja se refiere a HSA al 0,005 %. En otra modalidad albúmina baja se refiere a HSA al 0,001 %.

- 5 El valor de IC₅₀ a alta concentración de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Como se conoce, los derivados de GLP-1 también se unen a albúmina. Este es un efecto generalmente deseable, el que extiende su tiempo de vida media en plasma. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ a albúmina alta generalmente será mayor que el valor de IC₅₀ a albúmina baja, correspondiente a una unión reducida al receptor de GLP-1, provocada por la unión a albúmina que compite con la unión al receptor de GLP-1.
- 10 Una relación alta (valor de IC₅₀ (albúmina alta) / valor de IC₅₀ (albúmina baja)) puede tomarse por lo tanto como una indicación de que el derivado en cuestión se une bien a albúmina (puede tener una vida media larga) y además *per se* se une bien al receptor de GLP-1 (el valor de IC₅₀ (albúmina alta) es alto y el valor de IC₅₀ (albúmina baja) es bajo). Por lo tanto, la unión a albúmina puede no siempre ser deseable, o la unión a albúmina puede hacerse muy fuerte. Por lo tanto, los intervalos deseables para IC₅₀ (albúmina baja), IC₅₀ (albúmina alta) / y la relación alta/baja puede variar de compuesto a compuesto, en dependencia del uso destinado y las circunstancias que rodean tal uso y de otras propiedades del compuesto de interés potencial.
- 15 Un ensayo adecuado para determinar la unión al receptor a alta y baja concentración de albúmina se describe en el ejemplo 34 en la presente. Los compuestos de la invención tienen una afinidad de unión al receptor muy buena (IC₅₀) en presencia de albúmina baja. Como promedio la IC₅₀ (albúmina baja) de los compuestos analizados en el ejemplo 34 es 14 nM.
- 20 Prolongación - tiempo de vida media in vivo en ratas
- 25 De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los derivados de la invención se prolongan. En una modalidad particular, la prolongación puede determinarse adecuadamente como el tiempo de vida media (T_{1/2}) in vivo en ratas después de una administración i.v. El tiempo de vida media en rata es al menos 4 horas, y puede ser tan largo como 10 horas o más.
- 30 Un ensayo adecuado para determinar el tiempo de vida media in vivo en ratas después de una administración i.v. se describe en el ejemplo 39 en la presente.
- 30 Prolongación - vida media in vivo en minicerdos
- 35 De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los derivados de la invención se prolongan. En una modalidad particular la prolongación puede determinarse, además o alternativamente, como el tiempo de vida media (T_{1/2}) in vivo en minicerdos después de la administración i.v. El tiempo de vida media es al menos 12 horas, puede ser al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, o al menos 60 horas, o incluso mayor.
- 40 Un ensayo adecuado para determinar el tiempo de vida media in vivo en minicerdos después de una administración i.v. se describe en el ejemplo 37 en la presente.
- 40 Biodisponibilidad oral
- 45 De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen una alta biodisponibilidad oral.
- 45 La biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 comerciales es muy baja. La biodisponibilidad oral de derivados de GLP-1 en desarrollo para administración i.v. o s.c. es muy baja.
- 50 En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de derivados de GLP-1 de una biodisponibilidad oral mejorada. Tales derivados podrían ser candidatos adecuados para administración oral, siempre que su potencia sea generalmente satisfactoria y/o siempre que su vida media también sea generalmente satisfactoria.
- 55 Los presentes inventores identificaron una novedosa clase de derivados de GLP-1, que tienen una biodisponibilidad oral sorprendentemente alta, y al mismo tiempo una potencia y/o tiempo de vida media satisfactorios.
- 55 Además, o alternativamente, estos derivados tienen una biodisponibilidad oral sorprendentemente mejorada, y al mismo tiempo una alta afinidad de unión (es decir un bajo valor de IC₅₀) al receptor de GLP-1 a una baja concentración de albúmina.
- 60 Estas características son de importancia con vistas a obtener una dosis oral diaria baja del ingrediente farmacéutico activo, lo cual es conveniente por varias razones, que incluyen, por ejemplo, economía de producción, probabilidad de posibles problemas de seguridad, así como cuestiones de comodidad de la administración, y preocupaciones ambientales.
- 65 Generalmente, el término biodisponibilidad se refiere a la fracción de una dosis administrada del ingrediente farmacéutico activo (API), tal como un derivado de la invención que alcanza la circulación sistémica sin cambiar. Por definición, cuando un API se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es 100 %. Sin embargo, cuando se administra a través de otras vías (tales como por vía oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a la degradación y/o

absorción incompleta y al metabolismo de primer paso). El conocimiento sobre la biodisponibilidad es esencial cuando se calculan las dosificaciones para vías de administración no intravenosas.

La biodisponibilidad oral absoluta compara la biodisponibilidad (estimada como el área bajo la curva o AUC) del API en la circulación sistémica después de la administración oral, con la biodisponibilidad de la misma API después de la administración intravenosa. Esta es la fracción de la API absorbida a través de la administración no intravenosa en comparación con la administración intravenosa correspondiente del mismo API. La comparación debe normalizarse para dosis si se usan diferentes dosis; en consecuencia, cada AUC se corrige dividiendo por la dosis correspondiente administrada.

Se realiza un gráfico de concentración plasmática de API en función del tiempo después de la administración tanto oral como intravenosa. La biodisponibilidad absoluta (F) es el AUC-oral corregida para dosis dividida por el AUC-intravenosa.

Los derivados de la invención tienen una biodisponibilidad oral absoluta que es superior a la de a) liraglutida, y/o b) semaglutida; preferentemente al menos 10 % superior, con mayor preferencia al menos 20 % superior, incluso con mayor preferencia al menos 30 % superior, o con la máxima preferencia al menos 40 % superior. Antes de analizar la biodisponibilidad oral los derivados de la invención pueden formularse adecuadamente como se conoce en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulínotropicos, por ejemplo mediante el uso de cualquiera de una o más de las formulaciones descritas en el documento WO 2008/145728.

En los ejemplos 35 y 40 se describen pruebas adecuadas predictivas de la biodisponibilidad oral. De acuerdo con estas pruebas, después de la inyección directa del derivado de GLP-1 en el lumen intestinal de ratas y/o después de una administración oral por gavage en ratas, se determina la concentración (exposición) de este en plasma, y se mide la exposición posterior en plasma del derivado de GLP-1,

Propiedades biofísicas

De acuerdo con el cuarto aspecto funcional, los derivados de la invención tienen propiedades biofísicas mejoradas. Estas propiedades incluyen pero no se limitan a estabilidad física y solubilidad. Las propiedades biofísicas mejoradas pueden ser un resultado de un cambio de las propiedades oligoméricas. Las propiedades biofísicas pueden medirse mediante el uso de métodos biofísicos estándar de química de proteínas. Las propiedades biofísicas de los derivados de la invención pueden compararse adecuadamente con las del GLP-1 nativo.

En la sección titulada "modalidades particulares" se describen modalidades particulares adicionales de la invención.

Procesos de producción

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

La porción de GLP-1 de los derivados de la invención (o sus fragmentos) tal como K¹²,K²⁷-GLP-1(7-37) o un análogo o fragmento de estos, puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica clásica, por ejemplo, síntesis peptídica en fase sólida mediante el uso de química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, ver, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, "Organic Synthesis on solid Phase", Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000, y "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Editado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000.

Además, o alternativamente, pueden producirse mediante métodos recombinantes, a saber, mediante el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el péptido en un medio de nutrientes adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido. Los ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas para la expresión de estos péptidos son: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también, líneas celulares BHK o CHO de mamíferos.

Aquellos derivados de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o un mimético monopeptido o dipéptido N-terminal unido covalentemente pueden, por ejemplo, producirse como se describe en la parte experimental. O ver, por ejemplo, Hodgson y otros: "The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids", *Chemical Society Reviews*, vol. 33, núm. 7 (2004), págs. 422-430; y el documento WO 2009/083549 A1 titulado "Preparación semi-recombinante de análogos de GLP-1".

Los ejemplos específicos de métodos para preparar varios derivados de la invención se incluyen en la parte experimental.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de la invención o una sal, amida o éster

farmacéuticamente aceptables de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede prepararse como se conoce en la técnica.

5 El término "excipiente" se refiere, en un sentido amplio, a cualquier componente aparte del/de los ingrediente/s terapéutico/s activo/s. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente.

10 El excipiente puede servir para diversos fines, por ejemplo como portador, vehículo, diluyente, auxiliar para tabletas, y/o para mejorar la administración, y/o la ingesta de la sustancia activa.

10 En la técnica se conoce la formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con diversos excipientes, véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo 19^{na} edición (1995) y cualquiera de las ediciones posteriores).

15 Los ejemplos no limitantes de excipientes son: Los disolventes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes quelantes y estabilizadores.

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

25 Alternativamente una composición farmacéutica puede ser una formulación sólida, por ejemplo una composición liofilizada o secada por pulverización, que puede usarse tal cual, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes de su uso.

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

30 Una composición farmacéutica puede comprender un tampón. El tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos.

35 Una composición farmacéutica puede comprender un conservante. El conservante puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidaurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) y sus mezclas. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml.

40 Una composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un aldito (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y sus mezclas. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. El azúcar alcohólico se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una modalidad, el aditivo alcohol de azúcar es manitol.

50 Una composición farmacéutica puede comprender un agente quelante. El agente quelante puede seleccionarse, por ejemplo, de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y sus mezclas. Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizante. El estabilizante puede ser por ejemplo uno o más inhibidores de la oxidación, inhibidores de la agregación, tensioactivos y/o uno o más inhibidores de proteasas. Los ejemplos no limitantes de estos diversos tipos de estabilizadores se describen a continuación.

60 El término "formación de agregados" se refiere a una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de ese polipéptido, lo que resulta en la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptidos se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

65

- Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. El término "aminoácido base" se refiere a uno o más aminoácidos (tales como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), o análogos de estos. Cualquier aminoácido puede estar presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de los mismos) del aminoácido base puede estar presente.
- Puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a metionina sulfóxido cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o sus combinaciones.
- Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. El estabilizante puede seleccionarse, por ejemplo, de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de estos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol y sales diferentes (por ejemplo, cloruro de sodio). Una composición farmacéutica puede comprender agentes estabilizantes adicionales tales como, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido de la oxidación de la metionina y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido de la agregación asociada a la congelación-descongelación o al cizallamiento mecánico.
- Una composición farmacéutica puede comprender uno o más tensioactivos, preferentemente un tensioactivo, al menos un tensioactivo o dos tensioactivos diferentes. El término "tensioactivo" se refiere a cualesquiera moléculas o iones que se comprenden de una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El tensioactivo puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos no iónicos y/o tensioactivos zwitteriónicos.
- Una composición farmacéutica puede comprender uno o más inhibidores de proteasas, tales como, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiamina tetraacético) y/o benzamidinaHCl.
- Los ingredientes adicionales, opcionales de una composición farmacéutica incluyen, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, iones metálico, vehículos oleosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina) y/o un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).
- Además, una composición farmacéutica puede formularse como se conoce en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulínótropicos, por ejemplo mediante el uso de una o más de las formulaciones descritas en el documento WO 2008/145728.
- Una dosis administrada puede contener de 0,01 mg - 100 mg del derivado, o de 0,01-50 mg, o de 0,01-20 mg, o de 0,01 - 10 mg del derivado.
- El derivado puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica. Puede administrarse a un paciente que lo necesita en diversos sitios, por ejemplo, en sitios tópicos tales como sitios de la piel o mucosa; en sitios que evitan la ingesta tales como en una arteria, e una vena, o en el corazón; y en sitios que implican la ingesta, tales como en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.
- La ruta de administración puede ser, por ejemplo, lingual; sublingual; bucal; en la boca; oral; en el estómago; en el intestino; nasal; pulmonar, tal como a través de los bronquiolos, los alvéolos o una combinación de estos; parenteral, epidérmico; dérmico; transdérmico; conjuntival; uretal; vaginal; rectal; y/u ocular. Una composición puede ser una composición oral, y la vía de administración es oral.
- Una composición puede administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo como una solución; una suspensión; una emulsión; una microemulsión; emulsiones múltiples; una espuma; un ungüento; una pasta; un yeso; una pomada; una tableta; una tableta recubierta; un chicle; un enjuague; una cápsula tal como cápsulas de gelatina duras o blandas; un supositorio; una cápsula rectal; gotas; un gel; un aerosol; un polvo; un aerosol; un inhalante; gotas oculares; una ungüento oftálmico; un enjuague oftálmico; un pesario vaginal; un anillo vaginal; un ungüento vaginal; una solución de inyección; una solución de transformación in situ, como la gelificación in situ, el fraguado, la precipitación y la cristalización in situ; una solución de infusión; o como un implante. Una composición puede ser una tableta, opcionalmente recubierta, una cápsula, o una goma de mascar.
- Una composición puede combinarse adicionalmente en un portador o sistema de administración de fármacos, por ejemplo para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la solubilidad. En una modalidad particular, una composición puede unirse a tal sistema a través de interacciones covalentes, hidrófobas y/o electrostáticas. El

propósito de tal composición puede ser, por ejemplo, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia y/o aumentar la satisfacción del paciente.

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

La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma o por medio de una bomba de infusión.

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

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

15 Una composición puede ser una formulación estabilizada. El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física y/o química aumentada, preferentemente ambas. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

20 El término "estabilidad física" se refiere a la tendencia del polipéptido a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como un resultado de exponer a estrés termo-mecánico y/o a la interacción con interfaces y superficies estabilizantes (tales como superficies hidrófobas). La estabilidad física de una formulación acuosa de polipéptido se evaluó por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer a estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. Alternativamente, la estabilidad física puede evaluarse mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional del polipéptido tal como por ejemplo Tioflavina T o sondas de "parche hidrófobo".

25 El término "estabilidad química" se refiere a cambios químicos (en particular covalentes) en la estructura polipeptídica que conduce a la formación de productos de degradación química que tienen potencialmente una potencia biológica reducida, y/o efecto inmunogénico aumentado en comparación con el polipéptido intacto. La estabilidad química puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en diversos puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales, por ejemplo mediante SEC-HPLC, y/o RP-HPLC.

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

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

Indicaciones farmacéuticas

5 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere, además, a un derivado de la invención para el uso como un medicamento.

10 En modalidades particulares, el derivado de la invención puede usarse para los siguientes tratamientos médicos, todos preferentemente relacionados de una forma u otra con la diabetes:

15 (i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo 1, diabetes no dependiente de insulina, MODY (diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes), diabetes gestacional y/o reducción de HbA1C;

(ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión en la diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT, por sus siglas en inglés) a diabetes tipo 2 que requiere insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;

20 (iii) mejorar la función de las células β , tal como disminuir la apoptosis de las células β , aumentar la función de las células β y/o la masa de células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β ;

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

25 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, mediante disminución de la ingesta de alimentos, mediante reducción del peso corporal, mediante supresión del apetito, por inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracón, la bulimia nerviosa y/u obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la motilidad gástrica; y/o retardar el vaciamiento gástrico;

30 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; o retinopatía;

35 (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; disminución de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL; disminución de triglicéridos; reducir colesterol; aumentar HDL; reducir los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)) en un humano; inhibir la generación de apolipoproteína a (apo(a)) in vitro y/o in vivo;

40 (viii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X; aterosclerosis; infarto de miocardio; enfermedad coronaria; accidente cerebrovascular, isquemia cerebral; una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, tal como la hipertrofia ventricular izquierda; enfermedad de la arteria coronaria; hipertensión esencial; emergencia hipertensiva aguda; cardiomiopatía; insuficiencia cardíaca; tolerancia al ejercicio; insuficiencia cardíaca crónica; arritmia; disritmia cardíaca; síncope, aterosclerosis; insuficiencia cardíaca crónica leve; angina de pecho; reoclusión de derivación cardíaca; claudicación intermitente (aterosclerosis ocluyente); disfunción diastólica; y/o disfunción sistólica;

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

50 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía por enfermedad crítica (CIPNP, por sus siglas en inglés), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención de enfermedades críticas o desarrollo de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) en un paciente; y/o para la prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o

55 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés).

60 En una modalidad particular, la indicación se selecciona del grupo que consiste en (i)-(iii) y (v)-(ix), tal como las indicaciones (i), (ii) y/o (iii); o indicación (v), indicación (vi), indicación (vii), y/o indicación (ix).

65 En otra modalidad particular, la indicación es (i). En una modalidad particular adicional, la indicación es (v). En aún una modalidad particular, la indicación es (ix).

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

65 Modalidades particulares

ES 2 712 945 T3

Las siguientes son modalidades particulares descritas en la presente.

1. Un derivado de un análogo de GLP-1,

5 en donde el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K^{27} , y el segundo residuo K se designa K^T ;

10 dicho derivado comprende una primera y una segunda porción de prolongación unidas a K^{27} y K^T , respectivamente, por medio de un primer y un segundo enlazador, respectivamente, en donde

la primera y la segunda porción de prolongación se seleccionan del Químico 1 y el Químico 2:

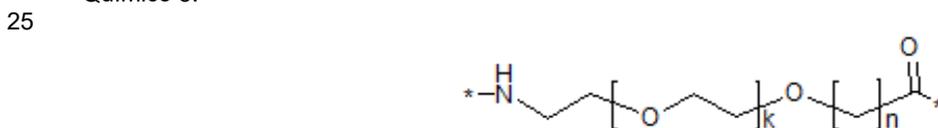
15 Químico 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$

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

20 en donde x es un número entero en el intervalo de 6-16, y es un número entero en el intervalo de 3-17; y

el primer y el segundo enlazador comprende el Químico 5:

Químico 5:



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

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 2. El derivado de la modalidad 1, en donde T es un entero seleccionado del intervalo de 7-37, excepto 18 y 27.

3. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-2, en donde T se selecciona de cualquiera de los intervalos de 7-17, 19-26 y 28-37.

40 4. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde T se selecciona del intervalo de 7-17.

5. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-4, en donde T es 12.

6. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde T se selecciona del intervalo de 19-26.

45 7. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, y 6, en donde T se selecciona del grupo que consiste en 20, 22 y 24.

8. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3 y 6-7, en donde T es 20.

50 9. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3 y 6-7, en donde T es 22 o 24.

10. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, 6-7 y 9, en donde T es 22.

55 11. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, 6-7 y 9, en donde T es 24.

12. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde T se selecciona del intervalo de 28-37.

60 13. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3 y 12, en donde T se selecciona del grupo que consiste en 36 y 37.

14. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3 y 12-13, en donde T es 36.

15. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3 y 12, en donde T es 37.

65 16. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-16, en donde la posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

17. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-16, en donde la posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

5 18. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-17, en donde la posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

10 19. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-18, en donde la posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

15 20. El derivado de la modalidad 19, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento Needleman-Wunsch.

20 21. El derivado de cualquiera de las modalidades 19-20, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.

22. El derivado de cualquiera de las modalidades 19-21, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.

23. El derivado de cualquiera de las modalidades 19-22, en donde la penalización del primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).

25 24. El derivado de cualquiera de las modalidades 19-23, en donde las penalizaciones de los residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).

25 25. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-24, en donde el análogo no comprende residuos de K distintos del primer y el segundo residuo de K.

30 26. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, en donde la porción de prolongación es el Químico 1.

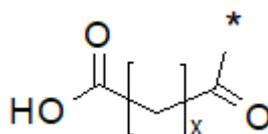
27. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-26, en donde x es un número par.

28. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-27, en donde x es 12.

35 29. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-28, en donde el Químico 1 se representa por el Químico 1a:

Químico 1a:

40



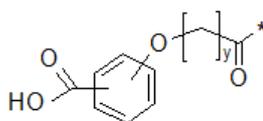
45

30. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, en donde la porción de prolongación es el Químico 2.

50 31. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30, en donde el Químico 2 se representa por el Químico 2a:

Químico 2a:

55



60

32. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-31, en donde "y" es un número impar.

33. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-32, en donde y es un número entero en el intervalo de 9-11.

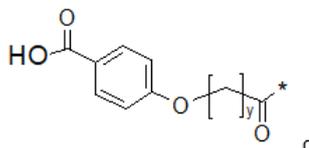
65

34. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-33, en donde y es 9.

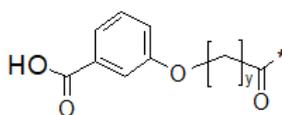
35. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-33, en donde y es 11.

36. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-35, en donde el Químico 2 se representa por el Químico 2b, o el Químico 2c:

Químico 2b:



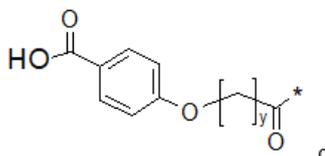
Químico 2c:



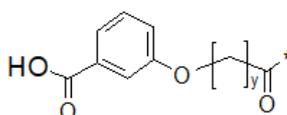
37. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, y 30-35, en donde el Químico 2 se representa por el Químico 2b.

38. El derivado de cualquiera de las modalidades 31-35, en donde el Químico 2a se representa por el Químico 2b, o el Químico 2c:

Químico 2b:



Químico 2c:



39. El derivado de cualquiera de las modalidades 31-35, y 38, en donde el Químico 2a se representa por el Químico 2b.

40. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-39, en donde el Químico 5 es un primer elemento conector.

41. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-40, en donde k es 1.

42. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-41, en donde n es 1.

43. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-42, en donde el Químico 5 se incluye m veces, en donde m es un número entero en el intervalo de 1-10.

44. El derivado de la modalidad 43, en donde m es 2.

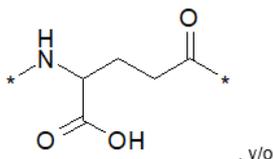
45. El derivado de cualquiera de las modalidades 43-44, en donde cuando m no es 1, el Químico 5 se interconectan mediante enlace(s) amida.

46. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-45, en donde el conector comprende además un segundo elemento conector.

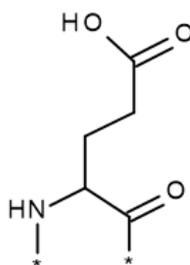
47. El derivado de la modalidad 46, en donde el segundo elemento enlazador es un dirradical Glu.

48. El derivado de cualquiera de las modalidades 46-47, en donde el segundo elemento conector se selecciona del Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:



Químico 7:



49. El derivado de la modalidad 48, en donde el segundo elemento enlazador es el Químico 6.

50. El derivado de cualquiera de las modalidades 46-49, en donde el dirradical Glu se incluye p veces, en donde p es un número entero en el intervalo de 1-2.

51. El derivado de la modalidad 50, en donde p es 1.

52. El derivado de la modalidad 50, en donde p es 2.

53. El derivado de cualquiera de las modalidades 46-52, en donde el dirradical Glu es un radical de L-Glu.

54. El derivado de cualquiera de las modalidades 46-53, en donde uno o más dirradicales Glu y uno o más del Químico 5 se interconectan mediante enlace(s) amida.

55. El derivado de cualquiera de las modalidades 46-54, en donde el enlazador consiste en m veces el Químico 5 y p veces el dirradical Glu.

56. El derivado de la modalidad 55, en donde (m,p) es (2,2) o (2,1).

57. El derivado de la modalidad 56, en donde (m,p) es (2,1).

58. El derivado de cualquiera de las modalidades 55-57, en donde m Químico 5 elementos y los p dirradicales Glu están interconectados por medio de enlaces amida.

59. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-58, en donde el conector y la porción de prolongación se interconectan mediante un enlace amida.

60. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-59, en donde el conector y el análogo de GLP-1 se interconectan mediante un enlace amida.

61. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-60, en donde el conector se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.

62. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-61, en donde el enlazador tiene de 5 a 41 átomos de C.

63. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-62, en donde el enlazador tiene 17 o 22 átomos de C.
- 5 64. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63, en donde el enlazador tiene 17 átomos de C.
65. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63, en donde el enlazador tiene 22 átomos de C.
66. El derivado de las modalidades 1-65, en donde el enlazador tiene de 4 a 28 heteroátomos.
- 10 67. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-66, en donde el enlazador tiene 12 o 16 heteroátomos.
68. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-67, en donde el enlazador tiene 12 heteroátomos.
69. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-67, en donde el enlazador tiene 16 heteroátomos.
- 15 70. El derivado de cualquiera de las modalidades 66-70, en donde los heteroátomos son átomos de N y/o O.
71. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-70, en donde el enlazador tiene de 1 a 7 átomos de N.
- 20 72. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el enlazador tiene 3 o 4 átomos de N.
73. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-72, en donde el enlazador tiene 3 átomos de N.
74. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-72, en donde el enlazador tiene 4 átomos de N.
- 25 75. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-74, en donde el enlazador tiene de 3 a 21 átomos de O.
76. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el enlazador tiene 9 o 12 átomos de O.
- 30 77. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-76, en donde el enlazador tiene 9 átomos de O.
78. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-76, en donde el enlazador tiene 12 átomos de O.
- 35 79. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el enlazador consiste en dos veces el Químico 6 y dos veces el Químico 5, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{27} o K^T del análogo de GLP-1.
- 40 80. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el enlazador consiste en dos veces el Químico 5 y una vez el Químico 6, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación, y en su extremo *-CO libre al grupo épsilon amino de K^{27} o K^T del análogo de GLP-1.
- 45 81. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el enlazador consiste en una vez el Químico 6 y dos veces el Químico 5, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{27} o K^T del análogo de GLP-1.
- 50 82. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el enlazador consiste en una vez el Químico 6, dos veces el Químico 5, y una vez el Químico 6, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K^{27} o K^T del análogo de GLP-1.
- 55 83. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-82, en donde las dos porciones de prolongación son sustancialmente idénticas.
84. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-83, en donde las dos porciones de prolongación son a) al menos 80 %, b) al menos 85 %, c) al menos 90 %, d) al menos 95 %, o e) al menos 99 % idénticas.
- 60 85. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-83, en donde las dos porciones de prolongación tienen una similitud de a) al menos 0,5; b) al menos 0,6; c) al menos 0,7; d) al menos 0,8; e) al menos 0,9; o f) al menos 0,99.
86. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-85, en donde las dos porciones de prolongación tienen una similitud de 1,0.
- 65 87. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-86, en donde los dos conectores son sustancialmente idénticos.

88. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-87, en donde los dos enlazadores tienen una similitud de al menos 0,5.
- 5 89. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-88, en donde los dos enlazadores tienen una similitud de a) al menos 0,6; b) al menos 0,7, c) al menos 0,8; d) al menos 0,9; o e) al menos 0,99.
90. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-89, en donde los dos enlazadores tienen una similitud de 1,0.
91. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-90, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el enlazador son sustancialmente idénticas.
- 10 92. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-91, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el enlazador, son a) al menos 80 %, b) al menos 85 %, c) al menos 90 %, d) al menos 95 %, o e) al menos 99 % idénticos.
- 15 93. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-92, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales que consisten en una porción de prolongación y un enlazador, tienen una similitud de a) al menos 0,5; b) al menos 0,6; c) al menos 0,7, d) al menos 0,8; e) al menos 0,9; o f) al menos 0,99.
94. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-92, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el enlazador, tienen una similitud de 1,0.
- 20 95. El derivado de cualquiera de las modalidades 83-94, en donde las dos estructuras químicas que se van a comparar se representan como huellas.
- 25 96. El derivado de la modalidad 95, en donde las huellas son a) huellas de ECFP_6; b) huellas de UNITY; y/o c) huellas de MDL.
97. El derivado de cualquiera de las modalidades 95-96, en donde el coeficiente de Tanimoto se usa preferentemente para calcular la similitud, o identidad, de las dos huellas.
- 30 98. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-97, en donde el número de aminoácidos cambia en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifican por escritura e inspección visual.
- 35 99. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-98, en donde el número de aminoácidos cambia en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifican mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
100. El derivado de la modalidad 99, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento Needleman-Wunsch.
- 40 101. El derivado de cualquiera de las modalidades 99-100, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 45 102. El derivado de cualquiera de las modalidades 99-101, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
103. El derivado de cualquiera de las modalidades 99-102, en donde la penalización del primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 50 104. El derivado de cualquiera de las modalidades 99- 103, en donde las penalizaciones de los residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
105. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-104, en donde el(los) cambio(s) aminoácidos es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): 8, 12, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38 y 39.
- 55 106. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-105, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Aib⁸, K¹², K²⁰, E²² o K²², E²³, K²⁴, V²⁵, R²⁶ o H²⁶, K²⁷, E³⁰, H³¹, G³⁴ o R³⁴ o Q³⁴, Des³⁵, K³⁶ o Des³⁶, K³⁷ o Des³⁷, E³⁸ o Q³⁸, y/o G³⁹.
- 60 107. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K¹² y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 65 108. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K²⁰ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶, H²⁶.

109. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K²² y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 5 110. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K²⁴ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 10 111. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K³⁶ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 15 112. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-106, en donde el segundo residuo de K es K³⁷ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴, R³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 20 113. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-112, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Aib⁸, E²², E²³, V²⁵, E³⁰, H³¹, Des³⁵, Des³⁶, Des³⁷, E³⁸ o Q³⁸, y/o G³⁹.
114. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-113, en donde el análogo comprende Aib⁸.
115. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-114, en donde el análogo comprende E²².
- 25 116. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-115, en donde el análogo comprende E²³.
117. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-116, en donde el análogo comprende V²⁵.
118. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-117, en donde el análogo comprende E³⁰.
- 30 119. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-118, en donde el análogo comprende H³¹.
120. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-119, en donde el análogo comprende Des³⁷.
- 35 121. El derivado de la modalidad 120, en donde el análogo comprende Des³⁶.
122. El derivado de cualquiera de las modalidades 121, en donde el análogo comprende Des³⁵.
- 40 123. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-119, en donde el análogo comprende E³⁸ o Q³⁸.
124. El derivado de la modalidad 123, en donde el análogo comprende Q³⁸.
125. El derivado de la modalidad 123, en donde el análogo comprende E³⁸.
- 45 126. El derivado de cualquiera de las modalidades 123-125, en donde el análogo comprende G³⁹.
127. El derivado de la modalidad 122, que es un derivado de GLP-1(7-34) (aminoácidos 1-28 de sec. con núm. de ident.: 1).
- 50 128. El derivado de la modalidad 121, que es un derivado de GLP-1(7-35) (aminoácidos 1-29 de sec. con núm. de ident.: 1).
129. El derivado de la modalidad 120, que es un derivado de GLP-1(7-36) (aminoácidos 1-30 de sec. con núm. de ident.: 1).
- 55 130. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-119, que es un derivado de GLP-1(7-37) (aminoácidos 1-31 de sec. con núm. de ident.: 1).
131. El derivado de cualquiera de las modalidades 123-125, que es un derivado de GLP-1(7-38) (aminoácidos 1-31 de la sec. con núm. de ident.: 1, más un residuo de aminoácido añadido en el extremo C-terminal).
- 60 132. El derivado de cualquiera de las modalidades 126, que es un derivado de GLP-1(7-39) (aminoácidos 1-31 de la sec. con núm. de ident.: 1, más dos residuos de aminoácidos añadidos en el extremo C-terminal).
- 65 133. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de nueve cambios de aminoácidos.

134. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de ocho cambios de aminoácidos.
- 5 135. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de siete cambios de aminoácidos.
136. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de seis cambios de aminoácidos.
- 10 137. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de cinco cambios de aminoácidos.
138. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 15 139. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de tres cambios de aminoácidos.
140. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de dos cambios de aminoácidos.
- 20 141. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de un cambio de aminoácido.
142. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-140, en donde el análogo tiene un mínimo de un cambio de aminoácido.
- 25 143. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-139, en donde el análogo tiene un mínimo de dos cambios de aminoácidos.
- 30 144. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-138, en donde el análogo tiene un mínimo de tres cambios de aminoácidos.
145. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-137, en donde el análogo tiene un mínimo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 35 146. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-136, en donde el análogo tiene un mínimo de cinco cambios de aminoácidos.
147. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-135, en donde el análogo tiene un mínimo de seis cambios de aminoácidos.
- 40 148. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-134, en donde el análogo tiene un mínimo de siete cambios de aminoácidos.
- 45 149. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-133, en donde el análogo tiene un mínimo de ocho cambios de aminoácidos.
150. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un mínimo de nueve cambios de aminoácidos.
- 50 151. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un cambio de aminoácidos.
152. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene dos cambios de aminoácidos.
- 55 153. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene tres cambios de aminoácidos.
154. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene cuatro cambios de aminoácidos.
155. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene cinco cambios de aminoácidos.
- 60 156. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene seis cambios de aminoácidos.
157. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene siete cambios de aminoácidos.
158. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene ocho cambios de aminoácidos.
- 65 159. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene nueve cambios de aminoácidos.

160. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene diez cambios de aminoácidos.
161. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-160, en donde los cambios son, independientemente, sustituciones, adiciones y/o deleciones.
- 5 162. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-161, en donde el análogo comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I:
- 10 Fórmula I: Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉, en donde
- 15 Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, N^α-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;
- 20 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₁₂ es Lys o Phe;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- 25 Xaa₁₈ es Ser, Arg, Asn, Gln, o Glu;
- Xaa₁₉ es Tyr o Gln;
- 30 Xaa₂₀ es Leu, Lys, o Met;
- Xaa₂₂ es Gly, Glu, Lys, o Aib;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, o Arg;
- 35 Xaa₂₄ es Ala o Lys;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- 40 Xaa₂₆ es Val, His, o Arg;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, o Arg;
- Xaa₃₁ es Trp o His;
- 45 Xaa₃₄ es Glu, Asn, Gly, Gln, o Arg;
- Xaa₃₅ es Gly, Aib, o ausente;
- 50 Xaa₃₆ es Arg, Gly, Lys, o ausente;
- Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, Arg, o está ausente;
- Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Gln, Pro, Arg, o está ausente; y
- 55 Xaa₃₉ es Gly o ausente.
163. El derivado de la modalidad 162, en donde el análogo es un análogo de GLP-1 de Fórmula I.
- 60 164. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-163, en donde el péptido de la Fórmula I es un análogo de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
165. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-164, en donde si Xaa₃₈ está ausente, entonces Xaa₃₉ también está ausente.
- 65 166. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-165, en donde si Xaa₃₇ está ausente, entonces Xaa₃₈ y Xaa₃₉ también están ausentes.

ES 2 712 945 T3

167. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-166, en donde si Xaa₃₆ está ausente, entonces Xaa₃₇, Xaa₃₈, y Xaa₃₉ también están ausentes.
- 5 168. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-167, en donde si Xaa₃₅ está ausente, entonces Xaa₃₆, Xaa₃₇, Xaa₃₈, y Xaa₃₉ también están ausentes.
- 10 169. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-168, en donde Xaa₇ es His; Xaa₈ es Ala o Aib; Xaa₁₂ es Lys o Phe; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu o Lys; Xaa₂₂ es Glu, Gly o Lys; Xaa₂₃ es Gln o Glu; Xaa₂₄ es Ala o Lys; Xaa₂₅ es Ala o Val; Xaa₂₆ es His o Arg; Xaa₃₀ es Ala o Glu; Xaa₃₁ es Trp o His; Xaa₃₄ es Gly, Gln, o Arg; Xaa₃₅ es Gly o está ausente; Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente; Xaa₃₇ es Gly, Lys, o está ausente; Xaa₃₈ es Glu o Gln; y Xaa₃₉ es Gly o está ausente.
170. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-169, en donde Xaa₇ es His.
- 15 171. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-170, en donde Xaa₈ es Ala.
172. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-170, en donde Xaa₈ es Aib.
- 20 173. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-172, en donde Xaa₁₂ es Lys.
174. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-172, en donde Xaa₁₂ es Phe.
175. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-174, en donde Xaa₁₆ es Val.
- 25 176. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-175, en donde Xaa₁₈ es Ser.
177. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-176, en donde Xaa₁₉ es Tyr.
- 30 178. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-177, en donde Xaa₂₀ es Leu.
179. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-177, en donde Xaa₂₀ es Lys.
180. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-179, en donde Xaa₂₂ es Glu.
- 35 181. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-179, en donde Xaa₂₂ es Gly.
182. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-179, en donde Xaa₂₂ es Lys.
- 40 183. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-182, en donde Xaa₂₃ es Gln.
184. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-182, en donde Xaa₂₃ es Glu.
185. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-184, en donde Xaa₂₄ es Ala.
- 45 186. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-184, en donde Xaa₂₄ es Lys.
187. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-186, en donde Xaa₂₅ es Ala.
- 50 188. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-186, en donde Xaa₂₅ es Val.
189. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-188, en donde Xaa₂₆ es His.
190. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-188, en donde Xaa₂₆ es Arg.
- 55 191. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-190, en donde Xaa₃₀ es Ala.
192. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-190, en donde Xaa₃₀ es Glu.
- 60 193. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-192, en donde Xaa₃₁ es Trp.
194. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-192, en donde Xaa₃₁ es His.
195. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-194, en donde Xaa₃₄ es Gly.
- 65 196. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-194, en donde Xaa₃₄ es Gln.
197. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-194, en donde Xaa₃₄ es Arg.

ES 2 712 945 T3

198. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-197, en donde Xaa₃₅ es Gly.
199. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-198, en donde Xaa₃₅ está ausente.
- 5 200. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-199, en donde Xaa₃₆ es Arg.
201. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-199, en donde Xaa₃₆ es Lys.
202. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-199, en donde Xaa₃₆ está ausente.
- 10 203. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-202, en donde Xaa₃₇ es Gly.
204. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-202, en donde Xaa₃₇ es Lys.
- 15 205. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-202, en donde Xaa₃₇ está ausente.
206. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-205, en donde Xaa₃₈ es Glu.
207. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-205, en donde Xaa₃₈ es Gln.
- 20 208. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-205, en donde Xaa₃₈ está ausente.
209. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-208, en donde Xaa₃₉ es Gly.
- 25 210. El derivado de cualquiera de las modalidades 162-208, en donde Xaa₃₉ está ausente.
211. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-210, en donde el análogo comprende los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (iix) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; o (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G.
- 30 212. El derivado de la modalidad 211, en donde el análogo tiene un conjunto de cambios de aminoácidos como se define en cualquiera de (i)-(xxvii).
- 35 213. Un compuesto seleccionado de los siguientes: Chem. 50, Químico 51, Químico 52, Químico 53, Químico 54, Químico 55, Químico 56, Químico 57, Químico 58, Químico 59, Químico 60, Químico 61, Químico 62, Químico 63, Químico 64, Químico 65, Químico 66, Químico 67, Químico 68, Químico 69, Químico 70, Químico 71, Químico 72, Químico 73, Químico 74, Químico 75, Químico 76, Químico 77, Químico 78, Químico 79, Químico 80 y Químico 81; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
- 40 214. El compuesto de la modalidad 213, que es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-212.
- 45 215. Un compuesto caracterizado por su nombre y seleccionado de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-32 de la presente descripción; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 50 216. El compuesto de la modalidad 215, que es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-214.
- 55 217. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-216, que tiene actividad de GLP-1.
- 60 218. El derivado de la modalidad 217, en donde la actividad de GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
219. El derivado de la modalidad 217, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro.
- 65 220. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-219, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide como la potencia de la producción de cAMP.

ES 2 712 945 T3

221. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-220, que tiene una potencia correspondiente a un EC_{50}
- 5 a) por debajo de 10000 pM, con mayor preferencia por debajo de 5000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 4000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 3000 pM;
- b) por debajo de 2000 pM, preferentemente por debajo de 1500 pM, con mayor preferencia por debajo de 1200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 1000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 500 pM;
- 10 c) por debajo de 400 pM, preferentemente por debajo de 300 pM, con mayor preferencia por debajo de 200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM; o
- d) por debajo de 80 pM, preferentemente por debajo de 60 pM, con mayor preferencia por debajo de 40 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 30 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 20 pM.
- 15 222. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-221, en donde la potencia se determina como la EC_{50} para la curva de dosis-respuesta que muestra la formación de cAMP de manera dependiente de la dosis en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano.
223. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-222, en donde una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13).
- 20 224. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-223, en donde para la determinación de cAMP un ensayo de receptor funcional.
- 25 225. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-224, en donde el ensayo se basa en una competencia entre el cAMP formado endógenamente y cAMP marcado con biotina y añadido de manera exógena.
226. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-225, en dicho ensayo el cAMP es capturado mediante el uso de un anticuerpo específico.
- 30 227. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-226, en donde el ensayo es el Ensayo de cAMP AlphaScreen.
228. El derivado de cualquiera de las modalidades 219-227, en donde el ensayo se describe en el ejemplo 33.
- 35 229. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-228, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide como la capacidad de unión al receptor en presencia de una concentración de albúmina baja, en donde la concentración de albúmina baja es HSA al 0,005 %, o, preferentemente, HSA al 0,001 %.
230. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-229, para el cual la relación [afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta), dividido por la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja)] es:
- 40 a) al menos 1,0, con mayor preferencia al menos 10, aún con mayor preferencia al menos 25, o con la máxima preferencia al menos 50;
- 45 b) al menos 60, preferentemente al menos 70, con mayor preferencia al menos 90, incluso con mayor preferencia al menos 80, o con la máxima preferencia al menos 100;
- d) al menos 125, preferentemente al menos 150, con mayor preferencia al menos 200, aún con mayor preferencia al menos 250, incluso con mayor preferencia al menos 400, o con la máxima preferencia al menos 500; o
- 50 d) al menos 600, preferentemente al menos 800, aún con mayor preferencia al menos 900, o con la máxima preferencia al menos 1000.
- 55 231. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-230, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC_{50}) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja) está
- 60 a) por debajo de 1000 nM, preferentemente por debajo de 750 nM, con mayor preferencia por debajo de 500 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 400 nM;
- b) por debajo de 300 nM, preferentemente por debajo de 250 nM, con mayor preferencia por debajo de 200 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 nM;
- 65 c) por debajo de 50,0 nM, preferentemente por debajo de 15,0 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 10,0 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 5,0 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 1,0 nM

- d) por debajo de 0,80 nM, preferentemente por debajo de 0,60 nM, con mayor preferencia por debajo de 0,40 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 0,30 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 0,20 nM.
232. El derivado de las modalidades 217-231, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta) está
- 5 a) por debajo de 1000 nM, con mayor preferencia por debajo de 900 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 800 nM; o
- b) por debajo de 500 nM, preferentemente por debajo de 400 nM, con mayor preferencia por debajo de 300 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 150 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 50,0 nM.
- 10 166. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-232, en donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide mediante el desplazamiento de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.
- 15 233. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-232, en donde se usa un ensayo de unión a SPA.
234. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-233, en donde el receptor de GLP-1 se prepara mediante el uso de una línea celular transfectada y estable.
- 20 235. El derivado de cualquiera de las modalidades 217-234, en donde se usa una línea celular de hámster, preferentemente una línea celular de riñón de hámster bebé, tal como BHK tk-ts13.
236. El derivado de cualquiera de las modalidades 229-235, en donde el valor de IC₅₀ se determina como la concentración que desplaza el 50 % de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.
- 25 237. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-236, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de semaglutida.
- 30 238. El derivado de la modalidad 237, en donde la biodisponibilidad oral se mide in vivo en ratas.
239. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-239, en donde la biodisponibilidad oral se mide como exposición en plasma después de la inyección directa en el lumen intestinal.
- 35 240. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-239, para el cual la concentración plasmática (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de la inyección de una solución del derivado en el yeyuno de rata, dividida por la concentración (µM) de la solución inyectada (exposición corregida para la dosis a los 30 min) es a) al menos 39, b) al menos 40, c) al menos 60, d) al menos 80; e) al menos 100; f) al menos 125; o g) al menos 150.
- 40 241. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-240, para el cual la concentración plasmática (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de la inyección de una solución del derivado en el yeyuno de rata, dividido por la concentración (µM) de la solución inyectada (exposición corregida para dosis a los 30 min) es a) al menos 160, b) al menos 180, c) al menos 200, o d) al menos 250.
- 45 242. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-241, en donde el derivado de GLP-1 se analiza a una concentración de 1000 uM en una solución de 55 mg/ml de caprato de sodio.
243. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-242, en donde se usan ratas Sprague Dawley de sexo masculino.
- 50 244. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-243, en donde las ratas tienen un peso corporal a su llegada de aproximadamente 240 g.
245. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-244, en donde las ratas ayunan durante aproximadamente 18 horas antes del experimento.
- 55 246. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-245, en donde las ratas se someten a anestesia general después de haber ayunado y antes de la inyección del derivado en el yeyuno.
247. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-246, en donde el derivado se administra en la parte proximal del yeyuno (10 cm distal para el duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal para el ciego), preferentemente en la parte proximal del yeyuno.
- 60 248. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-247, en donde 100 µl del derivado se inyecta en el lumen del yeyuno a través de un catéter con una jeringa y posteriormente 200 µl de aire se empuja en el lumen del yeyuno con otra jeringa, que después se deja conectado al catéter para evitar el flujo de regreso en el catéter.
- 65

ES 2 712 945 T3

249. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-248, en donde las muestras de sangre (200 ul) se recolectan en tubos con EDTA a partir de la vena caudal a intervalos deseados, tales como en los tiempos 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min y se centrifuga durante 5 minutos, 10 000 G, a 4°C en 20 minutos.
- 5 250. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-249, en donde el plasma (por ejemplo, 75 ul) se separa, se congela inmediatamente y se mantiene a -20 °C hasta que se analiza la concentración plasmática del derivado.
251. El derivado de cualquiera de las modalidades 237-250, en donde se usa el LOCI (Ensayo Luminescente de Canalización de Oxígeno) para analizar la concentración plasmática del derivado.
- 10 252. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-251, en donde el derivado es eficaz a menor glucosa en sangre in vivo en ratones db/db.
253. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-252, en donde el derivado es eficaz a menor peso corporal in vivo en ratones db/db.
- 15 254. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-253, en donde los ratones db/db se tratan, s.c., con un intervalo adecuado de dosis del derivado de GLP-1 y la glucosa en sangre y/o el peso corporal se determina(n) a intervalos apropiados.
- 20 255. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-254, en donde la dosis del derivado de GLP-1 es 0,3 nmol/kg, 1,0 nmol/kg, 3,0 nmol/kg, 10 nmol/kg, 30 nmol/kg y 100 nmol/kg, en donde kg se refiere al peso corporal del ratón.
256. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-255, en donde un grupo de control se trata con vehículo, s.c., preferentemente el medio en el cual el derivado de GLP-1 se disuelve, por ejemplo con la siguiente composición: fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4.
- 25 257. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-256, en donde la glucosa en sangre se determina, y/o los ratones se pesan, en un tiempo de -½h (media hora antes de la dosificación (t=0)) y en los tiempos 1, 2, 4 y 8h.
- 30 258. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-257, en donde la concentración de glucosa se mide mediante el uso del método de la glucosa oxidasa.
259. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-258, en donde
- 35 (i) ED₅₀ (peso corporal (BW)) se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre delta BW (por ejemplo, disminuye) 8 horas después de la administración subcutánea del derivado; y/o
- (ii) ED₅₀ (la glucosa en sangre (BG)) se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre AUC (Área Bajo la Curva) de delta BG (por ejemplo, disminuye) 8 horas y/o 24 horas después de la administración subcutánea del derivado.
- 40 260. El derivado de cualquiera de las modalidades 252-259, en donde existe relación sigmoideal de respuesta a dosis, preferentemente con una clara definición de la respuesta máxima.
- 45 261. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-260, que tiene un perfil de acción más prolongado que liraglutida.
262. El derivado de la modalidad 261, en donde prolongación significa tiempo de vida media in vivo en una especie animal relevante.
- 50 263. El derivado de cualquiera de las modalidades 261-262, en donde el animal es a) ratones db/db, b) rata, c) cerdo y/o d) minicerdo.
264. El derivado de la modalidad 263, en donde el animal es minicerdo.
- 55 265. El derivado de cualquiera de las modalidades 261-264, en donde el derivado se administra i) s.c., y/o ii) i.v.
266. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-265, en donde el derivado se administra i.v.
- 60 267. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-266, en donde la vida media terminal (T_½) después de la administración i.v. en minicerdos es
- a) al menos 12 horas, preferentemente al menos 24 horas, con mayor preferencia al menos 36 horas, incluso con mayor preferencia al menos 48 horas, o con la máxima preferencia al menos 60 horas;
- 65 b) al menos 7 horas, preferentemente al menos 16 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, incluso con mayor preferencia al menos 30 horas, o con la máxima preferencia al menos 40 horas;

- c) al menos 50 horas, preferentemente al menos 60 horas, con mayor preferencia al menos 70 horas, incluso con mayor preferencia al menos 80 horas, o con la máxima preferencia al menos 90 horas.
- 5 268. El derivado de cualquiera de las modalidades 264-267, en donde los minicerdos son minicerdos machos Göttingen.
269. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-268, en donde los minicerdos tienen 7-14 meses de edad.
- 10 270. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-269, en donde el peso de los minicerdos es 16-35 kg.
271. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-270, en donde los minicerdos se alojan individualmente y se alimentan una o dos veces al día, preferentemente con dieta para minicerdo SDS.
- 15 272. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-271, en donde el derivado se dosifica, i.v., después de al menos 2 semanas de aclimatación.
273. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-272, en donde los animales se someten a ayuno durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y durante al menos 4 h después de la dosificación y tienen acceso ad libitum al agua durante todo el período.
- 20 274. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-273, en donde el derivado de GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 nM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración adecuada, preferentemente de 20-60 nmol/ml.
- 25 275. El derivado de cualquiera de las modalidades 267-275, en donde inyecciones intravenosas del derivado se dan en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.
276. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-275, que provoca una reducción de la ingesta de alimentos en los cerdos.
- 30 277. El derivado de la modalidad 276, en donde la ingesta se reduce respecto a un control, que es preferentemente tratado con vehículo, o no tratado.
- 35 278. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-277, en donde
la ingesta de alimentos (0-24 horas) es
- 40 a) 90 % o menor con respecto al control tratado con vehículo, b) preferentemente 80 % o menor, c) con mayor preferencia 70 % o menor, d) incluso con mayor preferencia 60 % o menor, o e) con la máxima preferencia 50 % o menor.
279. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-278, en donde la ingesta de alimentos (0-24 horas) se refiere a las primeras 24 horas después de la administración del derivado o vehículo.
- 45 280. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-279, en donde los cerdos son cerdos Landrace Yorkshire Duroc (LYD) de sexo femenino.
281. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-280, en donde los cerdos tienen 3 meses de edad.
- 50 282. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-281, en donde los cerdos tienen un peso de 30-35 kg.
283. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-282, en donde los animales se alojan en un grupo durante 1-2 semanas para la adaptación.
- 55 284. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-283, en donde durante el período experimental, los animales se colocan en corrales individuales desde el lunes por la mañana hasta el viernes por la tarde para la medición de la ingesta de alimentos individual.
285. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-284, en donde los animales se alimentan ad libitum con pienso de cerdo (tal como Svinefoder, Antonio).
- 60 286. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-285, en donde la ingesta de alimentos se monitorea en línea mediante el registro del peso del pienso cada 15 minutos, preferentemente mediante el uso del sistema Mpigwin.
- 65 287. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-286, cuya dosificación es 0,3, 1,0, 3,0, 10, o 30 nmol/kg.

ES 2 712 945 T3

288. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-287, que se disuelve en un tampón de fosfato (fosfato 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 8), preferentemente a concentraciones de 12, 40, 120, 400, o 1200 nmol/ml.
- 5 289. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-288, en donde el tampón de fosfato sirve como vehículo.
290. El derivado de cualquiera de las modalidades 276-289, en donde los animales se dosifican con una sola dosis subcutánea del derivado, o el vehículo (preferentemente con un volumen de dosis de 0,025 ml/kg) en la mañana del día 1 y la ingesta de alimentos se mide durante 4 días después de la dosificación.
- 10 291. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-290, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de a) al menos 4 horas, b) al menos 6 horas, c) al menos 8 horas, o d) al menos 10 horas.
- 15 292. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-291, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de a) al menos 12 horas, b) al menos 15 horas, c) al menos 18 horas, o d) al menos 20 horas.
- 20 293. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-292, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de a) al menos 24 horas, b) al menos 26 horas, o c) al menos 30 horas.
294. El derivado de cualquiera de las modalidades 291-294, en que las ratas son ratas Sprague Dawley de sexo masculino con un peso corporal de aproximadamente 400 g.
- 25 294. El derivado de cualquiera de las modalidades 238-294, para el cual el AUC de la curva de exposición a plasma (es decir, concentración plasmática en pM frente a tiempo) corregida para dosis (es decir, dividido por la dosis en pmol del derivado inyectado) desde el tiempo de 30 a 180 min se determina (es decir, el resultado se indica en (min x pM / pmol) o simplemente en min/L).
- 30 295. El derivado de la modalidad 294, en donde el AUC de la curva de exposición en plasma corregida para dosis es
- a) al menos 50, preferentemente al menos 100, o con mayor preferencia al menos 150 min/L;
- 35 b) al menos 200, preferentemente al menos 250, con mayor preferencia al menos 300, o con la máxima preferencia al menos 320 min/L; o
- c) al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2 veces, con mayor preferencia al menos 3 veces, o con la máxima preferencia al menos 4 veces el valor correspondiente de AUC para semaglutida.
- 40 296. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-295, en donde la biodisponibilidad oral se mide in vivo en ratas, como exposición en plasma después de la alimentación por sonda gástrica.
- 45 297. El derivado de la modalidad 296, para el cual el AUC de la curva de exposición en plasma (es decir, concentración plasmática en pM frente a tiempo) corregida para dosis (es decir, dividida por la dosis en pmol del derivado inyectado) desde el tiempo de 30 a 180 min se determina (es decir, el resultado puede indicarse en (min x pM / pmol) o simplemente en min/L).
- 50 298. El derivado de la modalidad 297, en donde el AUC de la curva de exposición en plasma corregida para dosis es
- a) al menos 10, preferentemente al menos 20, o con mayor preferencia al menos 30 min/L;
- b) al menos 40, preferentemente al menos 50, con mayor preferencia al menos 60, o con la máxima preferencia al menos 70 min/L; o
- 55 c) al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2 veces, con mayor preferencia al menos 3 veces, o con la máxima preferencia al menos 4 veces el valor correspondiente de AUC para semaglutida.
- 60 299. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-298, en donde el derivado de GLP-1 se analiza en una concentración de aproximadamente 1000 uM en una solución de 250 mg/ml de *N*-[8-(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato de sodio (SNAC).
300. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-299, en donde se usan ratas machos Sprague Dawley, preferentemente con un peso corporal a la llegada de aproximadamente 240 g.
- 65 301. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-300, en donde las ratas ayunan durante aproximadamente 18 horas antes del experimento.

- 5 302. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-301, en donde las ratas están y se toman en anestesia general después de haber ayunado y antes de la inyección del derivado en el yeyuno, o la alimentación por sonda gástrica, respectivamente.
303. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-302, en donde para la inyección en el lumen intestinal el derivado se administra en la parte proximal del yeyuno (10 cm distal para el duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal para el ciego), preferentemente en la parte proximal del yeyuno.
- 10 304. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-303, en donde 100 µl del derivado se inyecta en el lumen del yeyuno a través de un catéter con una jeringa de 1 ml y posteriormente 200 µl de aire se empuja en el lumen del yeyuno con otra jeringa, que después se deja conectado al catéter para evitar el flujo de regreso en el catéter.
- 15 305. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-304, en donde las muestras de sangre (200 µl) se recolectan en tubos con EDTA a partir de la vena caudal a intervalos deseados, tales como en los tiempos 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min y se centrifugan durante 5 minutos, 10 000 G, a 4°C en 20 minutos.
- 20 306. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-305, en donde el plasma (por ejemplo, 75 µl) se separa, se congela inmediatamente y se mantiene a -20 °C hasta que se analiza la concentración plasmática del derivado.
307. El derivado de cualquiera de las modalidades 294-306, en donde se usa el LOCI (Ensayo Luminiscente de Canalización de Oxígeno) para analizar la concentración plasmática del derivado.
- 25 308. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 38Q; y/o (ii) 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
309. El análogo de GLP-1 de la modalidad 308 que comprende (38E, 39G).
- 30 310. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xviii) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (ixx) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; o (xxvii) 8Aib, 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de este.
- 40 311. El análogo de GLP de la modalidad 310 que tiene un conjunto de cambios de aminoácidos como se definió en cualquiera de (i)-(xxvii).
- 45 312. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-307, para el uso como un medicamento.
313. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-307, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.
- 50 314. Un método para tratar o evitar todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética - mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-307.
- 55 Las siguientes son modalidades particulares adicionales descritas en la presente:
- 60 1. Un derivado de un análogo de GLP-1,
- 65 dicho análogo comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde

ES 2 712 945 T3

T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K²⁷, y el segundo residuo K se designa K^T;

dicho derivado comprende dos porciones de unión a albúmina unidas a K²⁷ y K^T, respectivamente, en donde

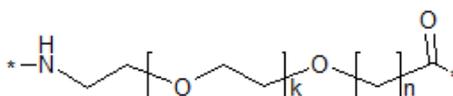
la porción de unión a albúmina comprende una porción de prolongación seleccionada del Químico 1 y el Químico 2:



en donde x es un número entero en el intervalo de 6-18 y "y" es un número entero en el intervalo de 3-17;

con la condición de que cuando la porción de prolongación es el Químico 1, la porción de unión a albúmina comprende además un enlazador de fórmula quím. 5:

Químico 5:



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

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. El derivado de la modalidad 1,

en donde el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K²⁷, y el segundo residuo K se designa K^T;

dicho derivado comprende dos porciones de unión a albúmina unidas a K²⁷ y K^T, respectivamente, en donde

la porción de unión a albúmina comprende una porción de prolongación del Químico 2:



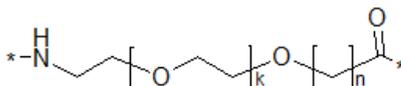
en donde "y" es un número entero en el intervalo de 3-17;

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

3. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la porción de unión a albúmina comprende además un enlazador.

4. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador comprende i) un dirradical Glu; y/o ii) un enlazador de fórmula quím. 5:

Químico 5:

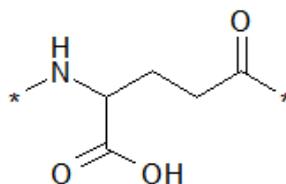


en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

5. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dirradical Glu se selecciona del Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:

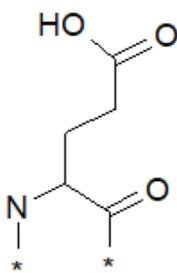
5



10

Químico 7:

15



20

25 preferentemente el Químico 6.

6. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores,

30

en donde el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K²⁷, y el segundo residuo K se designa K^T;

35

dicho derivado comprende dos porciones de unión a albúmina unidas a K²⁷ y K^T, respectivamente, en donde la porción de unión a albúmina comprende

40

i) una porción de prolongación de fórmula quím. 1:



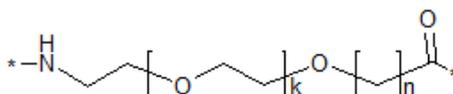
y en donde x es un número entero en el intervalo de 6-18; y

45

ii) un enlazador de fórmula quím. 5:

Químico 5:

50



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

55

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

7. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores,

60

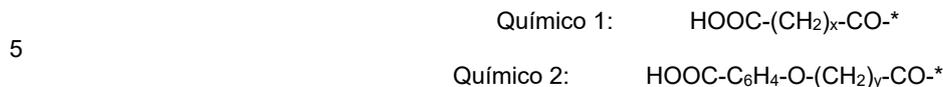
en donde el análogo de GLP-1 comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K²⁷, y el segundo residuo K se designa K^T;

65

dicho derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a K²⁷ y K^T, respectivamente, por medio de un enlazador, en donde

ES 2 712 945 T3

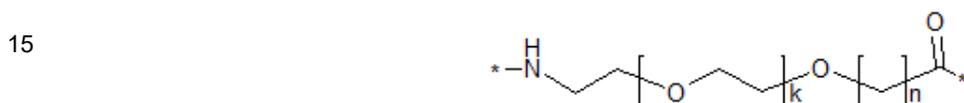
la porción de prolongación se selecciona del Químico 1 y el Químico 2:



en donde x es un número entero en el intervalo de 6-18, y es un número entero en el intervalo de 3-17; y

10 el enlazador comprende el Químico 5:

Químico 5:



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

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

25 8. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es un entero seleccionado del intervalo de 7-37, excepto 18 y 27.

9. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona de cualquiera de los intervalos de 7-17, 19-26 y 28-37.

30 10. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona del intervalo de 7-17.

11. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 12.

35 12. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona del intervalo de 19-26.

13. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona del grupo que consiste en 20, 22 y 24.

40 14. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 20.

15. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 22 o 24.

45 16. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 22.

17. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 24.

18. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona del intervalo de 28-37.

50 19. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T se selecciona del grupo que consiste en 36 y 37.

20. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 36.

55 21. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 37.

22. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

60 23. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

24. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

65

25. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

5 26. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento Needleman-Wunsch.

27. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.

10 28. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.

29. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la penalización del primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).

15 30. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las penalizaciones de los residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).

20 31. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo no comprende residuos de K distintos del primer y el segundo residuo de K.

32. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la porción de prolongación es el Químico 1.

33. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde x es un número par.

25 34. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde x es 12.

35. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 1 se representa por el Químico 1a:

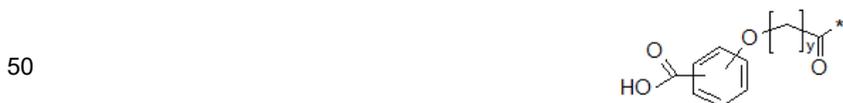
30 Químico 1a:



40 donde x es como se definió en cualquiera de las modalidades anteriores.

36. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la porción de prolongación es el Químico 2, preferentemente el Químico 2a:

45 Químico 2a:



55 en donde "y" es como se definió en cualquiera de las modalidades anteriores.

37. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde y es un número impar.

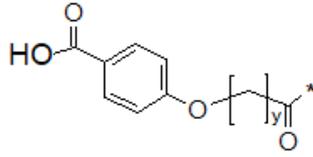
38. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde y es 9.

60 39. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 2 se representa por el Químico 2b, o el Químico 2c:

Químico 2b:

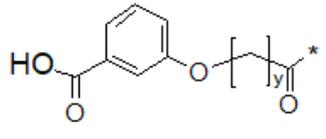
65

5



Químico 2c:

10



15

preferentemente por el Químico 2b;

20

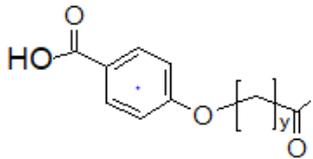
en donde "y" es como se definió en cualquiera de las modalidades anteriores.

39a. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 2a se representa por el Químico 2b, o el Químico 2c:

25

Químico 2b:

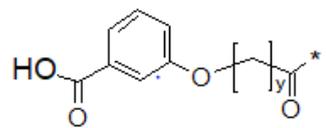
30



35

Químico 2c:

40



45

preferentemente por el Químico 2b;

50

en donde "y" es como se definió en cualquiera de las modalidades anteriores.

40. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende el Químico 5.

55

41. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 5 es un primer elemento conector.

42. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde k es 1.

60

43. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde n es 1.

44. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 5 se incluye m veces, en donde m es un número entero en el intervalo de 1-10.

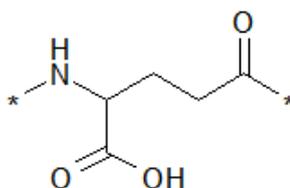
65

45. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde m es 2.

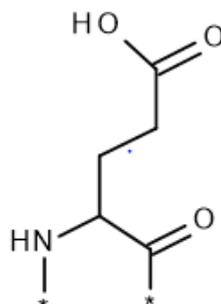
46. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde cuando m no es 1, el Químico 5 se interconectan mediante enlace(s) amida.

47. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador comprende además un segundo elemento enlazador; preferentemente un dirradical Glu; con mayor preferencia seleccionado del Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:



Químico 7:



con mayor preferencia el Químico 6.

48. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dirradical Glu se incluye p veces, en donde p es un número entero en el intervalo de 1-2.

49. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde p es 1.

50. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde p es 2.

51. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el dirradical Glu es un radical de L-Glu.

52. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el uno o más dirradicales Glu y el uno o más Químico 5 se interconectan mediante enlace(s) amida.

53. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en m veces el Químico 5 y p veces el dirradical Glu.

54. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde (m,p) es (2,2) o (2,1), preferentemente (2,1).

55. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los m Químico 5 elementos y los p dirradicales Glu están interconectados por medio de enlaces amida.

56. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector y la porción de prolongación se interconectan mediante un enlace amida.

57. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector y el análogo de GLP-1 se interconectan mediante un enlace amida.

58. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.

59. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene de 5 a 41 átomos de C; preferentemente 17 o 22 átomos de C.
- 5 60. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 17 átomos de C.
61. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 22 átomos de C.
62. El derivado de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene de 4 a 28 heteroátomos; preferentemente 12 o 16 heteroátomos.
- 10 63. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 12 heteroátomos.
64. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 16 heteroátomos.
- 15 65. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los heteroátomos son átomos de N y/u O.
66. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene de 1 a 7 átomos de N; preferentemente 3 o 4 átomos de N.
- 20 67. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 3 átomos de N.
68. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 4 átomos de N.
- 25 69. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene de 3 a 21 átomos de O; preferentemente 9 o 12 átomos de O.
70. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 9 átomos de O.
- 30 71. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador tiene 12 átomos de O.
72. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en dos veces el Químico 6 y dos veces el Químico 5, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K²⁷ o K^T del análogo de GLP-1.
- 35 73. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en dos veces el Químico 5 y una vez el Químico 6, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación, y en su extremo *-CO libre al grupo épsilon amino de K²⁷ o K^T del análogo de GLP-1.
- 40 74. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en una vez el Químico 6 y dos veces el Químico 5, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K²⁷ o K^T del análogo de GLP-1.
- 45 75. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en una vez el Químico 6, dos veces el Químico 5, y una vez el Químico 6, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, el enlazador está conectado en su extremo *-NH al extremo *-CO de la porción de prolongación y en su extremo *-CO al grupo épsilon amino de K²⁷ o K^T del análogo de GLP-1.
- 50 76. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las dos porciones de prolongación son sustancialmente idénticas; tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idénticas.
- 55 77. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las dos porciones de prolongación tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 60 78. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los dos conectores tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 65 79. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el enlazador, son sustancialmente idénticas; tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idénticas.

ES 2 712 945 T3

- 5 80. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los dos grupos de unión a albúmina, tal como las dos cadenas laterales consisten en una porción de prolongación y un enlazador, tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 10 81. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las dos estructuras químicas a comparar se representan como huellas, tales como a) huellas de ECFP_6; b) huellas de UNITY; y/o c) huellas de MDL; y en donde para cada uno de a), b) y c) el coeficiente de Tanimoto se usa preferentemente para calcular la similitud o identidad de las dos huellas.
- 15 82. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el número de aminoácidos cambia en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifican por escritura e inspección visual.
- 20 83. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el número de aminoácidos cambia en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1) se identifican mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 25 84. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento Needleman-Wunsch.
- 30 85. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 35 86. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
- 40 87. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la penalización del primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 45 88. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las penalizaciones de los residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
- 50 89. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el(los) cambio(s) aminoácidos es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): 8, 12, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38 y 39.
- 55 90. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Aib⁸, K¹², K²⁰, E²² o K²², E²³, K²⁴, V²⁵, R²⁶ o H²⁶, K²⁷, E³⁰, H³¹, G³⁴ o R³⁴ o Q³⁴, Des³⁵, K³⁶ o Des³⁶, K³⁷ o Des³⁷, E³⁸ o Q³⁸, y/o G³⁹.
- 60 91. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K¹² y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴, y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
- 65 92. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K²⁰ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴ y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
93. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K²² y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴, y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
94. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K²⁴ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴, y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
95. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K³⁶ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴, y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
96. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el segundo residuo de K es K³⁷ y en donde el análogo, además del cambio K²⁷, comprende además i) un cambio seleccionado de G³⁴ y Q³⁴, y ii) un cambio seleccionado de R²⁶ y H²⁶.
97. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Aib⁸, E²², E²³, V²⁵, E³⁰, H³¹, Des³⁵, Des³⁶, Des³⁷, E³⁸ o Q³⁸, y/o G³⁹.
98. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Aib⁸.

99. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende E²².
- 5 100. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende E²³.
101. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende V²⁵.
102. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende E³⁰.
- 10 103. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende E³¹.
104. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Des³⁵.
105. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Des³⁶.
- 15 106. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Des³⁷.
107. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende E³⁸ o Q³⁸, preferentemente Q³⁸, o con mayor preferencia E³⁸.
- 20 108. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende G³⁹.
109. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Des³⁵, Des³⁶, y Des³⁷.
- 25 110. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende Des³⁶ y Des³⁷.
111. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-34) (aminoácidos 1-28 de sec. con núm. de ident.: 1).
- 30 112. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-35) (aminoácidos 1-29 de sec. con núm. de ident.: 1).
113. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-36) (aminoácidos 1-30 de sec. con núm. de ident.: 1).
- 35 114. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-37) (aminoácidos 1-31 de sec. con núm. de ident.: 1).
115. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-38) (aminoácidos 1-31 de la sec. con núm. de ident.: 1, más un residuo de aminoácido añadido en el extremo C-terminal).
- 40 116. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que es un derivado de GLP-1(7-39) (aminoácidos 1-31 de la sec. con núm. de ident.: 1, más dos residuos de aminoácidos añadidos en el extremo C-terminal).
- 45 117. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de diez cambios de aminoácidos.
118. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de nueve cambios de aminoácidos.
- 50 119. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de ocho cambios de aminoácidos.
120. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de siete cambios de aminoácidos.
- 55 121. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de seis cambios de aminoácidos.
- 60 122. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de cinco cambios de aminoácidos.
123. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 65

ES 2 712 945 T3

124. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de tres cambios de aminoácidos.
- 5 125. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de dos cambios de aminoácidos.
126. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un máximo de uno cambios de aminoácidos.
- 10 127. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de uno cambios de aminoácidos.
128. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de dos cambios de aminoácidos.
- 15 129. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de tres cambios de aminoácidos.
- 20 130. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de cuatro cambios de aminoácidos.
131. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de cinco cambios de aminoácidos.
- 25 132. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de seis cambios de aminoácidos.
133. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de siete cambios de aminoácidos.
- 30 134. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de ocho cambios de aminoácidos.
- 35 135. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de nueve cambios de aminoácidos.
136. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un mínimo de diez cambios de aminoácidos.
- 40 137. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene un cambio de aminoácidos.
138. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene dos cambios de aminoácidos.
- 45 139. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene tres cambios de aminoácidos.
140. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene cuatro cambios de aminoácidos.
- 50 141. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene cinco cambios de aminoácidos.
142. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene seis cambios de aminoácidos.
- 55 143. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene siete cambios de aminoácidos.
144. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene ocho cambios de aminoácidos.
- 60 145. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene nueve cambios de aminoácidos.
146. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo tiene diez cambios de aminoácidos.
- 65 147. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los cambios son, independientemente, sustituciones, adiciones y/o deleciones.

148. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo

a) comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I; y/o b) es un análogo de GLP-1 de Fórmula I:

- 5 Fórmula I: Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-
Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉, en donde
Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, β-hidroxi-
histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, N^α-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina,
2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;
- 10 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)
carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)
carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- 15 Xaa₁₂ es Lys o Phe;
Xaa₁₆ es Val o Leu;
- 20 Xaa₁₈ es Ser, Arg, Asn, Gln, o Glu;
Xaa₁₉ es Tyr o Gln;
- 25 Xaa₂₀ es Leu, Lys, o Met;
Xaa₂₂ es Gly, Glu, Lys, o Aib;
- 30 Xaa₂₃ es Gln, Glu, o Arg;
Xaa₂₄ es Ala o Lys;
- 35 Xaa₂₅ es Ala o Val;
Xaa₂₆ es Val, His, o Arg;
- 40 Xaa₃₀ es Ala, Glu, o Arg;
Xaa₃₁ es Trp o His;
- 45 Xaa₃₄ es Glu, Asn, Gly, Gln, o Arg;
Xaa₃₅ es Gly, Aib, o ausente;
- 50 Xaa₃₆ es Arg, Gly, Lys, o ausente;
Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, Arg, o está ausente;
- 55 Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Gln, Pro, Arg, o está ausente; y
Xaa₃₉ es Gly o ausente.
149. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el péptido de la Fórmula I es un análogo de
GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1).
150. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde si Xaa₃₈ está ausente, entonces Xaa₃₉ también
está ausente.
151. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde si Xaa₃₇ está ausente, entonces Xaa₃₈ y Xaa₃₉
también están ausentes.
- 60 152. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde si Xaa₃₆ está ausente, entonces Xaa₃₇, Xaa₃₈,
y Xaa₃₉ también están ausentes.
- 65 153. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde si Xaa₃₅ está ausente, entonces Xaa₃₆, Xaa₃₇,
y Xaa₃₈ y Xaa₃₉ también están ausentes.

- 5 154. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₇ es His; Xaa₈ es Ala o Aib; Xaa₁₂ es Lys o Phe; Xaa₁₆ es Val; Xaa₁₈ es Ser; Xaa₁₉ es Tyr; Xaa₂₀ es Leu o Lys; Xaa₂₂ es Glu, Gly o Lys; Xaa₂₃ es Gln o Glu; Xaa₂₄ es Ala o Lys; Xaa₂₅ es Ala o Val; Xaa₂₆ es His o Arg; Xaa₃₀ es Ala o Glu; Xaa₃₁ es Trp o His; Xaa₃₄ es Gly, Gln, o Arg; Xaa₃₅ es Gly o está ausente; Xaa₃₆ es Arg, Lys, o está ausente; Xaa₃₇ es Gly, Lys, o está ausente; Xaa₃₈ es Glu o Gln; and Xaa₃₉ es Gly o está ausente.
- 10 154a. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₇ es His.
- 154b. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₈ es Ala.
- 154b1. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₈ es Aib.
- 154c. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₁₂ es Lys.
- 15 154d. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₁₂ es Phe.
- 154e. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₁₆ es Val.
- 20 154f. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₁₈ es Ser.
- 154 g. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₁₉ es Tyr.
- 154h. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₀ es Leu.
- 25 154i. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₀ es Lys.
- 154j. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₂ es Glu.
- 30 154k. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₂ es Gly.
- 154l. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₂ es Lys.
- 154m. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₃ es Gln.
- 35 154n. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₃ es Glu.
- 154o. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₄ es Ala.
- 154p. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₄ es Lys.
- 40 154q. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₅ es Ala.
- 154r. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₅ es Val.
- 45 154 s. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₆ es His.
- 154t. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₂₆ es Arg.
- 154u. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₀ es Ala.
- 50 154v. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₀ es Glu.
- 154x. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₁ es Trp.
- 154y. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₁ es His.
- 55 154z. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₄ es Gly.
- 154aa. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₄ es Gln.
- 60 154ab. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₄ es Arg.
- 154ac. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₅ es Gly.
- 154ad. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₅ está ausente.
- 65 154ae. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₆ es Arg.
- 154af. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₆ es Lys.

ES 2 712 945 T3

- 154ag. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₆ está ausente.
- 154ah. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₇ es Gly.
- 5 154ai. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₇ es Lys.
- 154aj. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₇ está ausente.
- 154ak. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₈ es Glu.
- 10 154al. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₈ es Gln.
- 154am. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₈ está ausente.
- 15 154an. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₉ es Gly.
- 154ao. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde Xaa₃₉ está ausente.
155. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo preferentemente tiene los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xviii) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (xix) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; o (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q.
156. Un compuesto, preferentemente de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, seleccionado de los siguientes: Chem. 50, Químico 51, Químico 52, Químico 53, Químico 54, Químico 55, Químico 56, Químico 57, Químico 58, Químico 59, Químico 60, Químico 61, Químico 62, Químico 63, Químico 64, Químico 65, Químico 66, Químico 67, Químico 68, Químico 69, Químico 70, Químico 71, Químico 72, Químico 73, Químico 74, Químico 75, Químico 76, Químico 77, Químico 78 y Químico 79; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
157. Un compuesto, preferentemente de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado por su nombre y seleccionado de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-30 de la presente descripción; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
158. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene actividad de GLP-1.
159. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la actividad de GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
160. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro, como la potencia de la producción de cAMP.
- 50 161. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene una potencia correspondiente a un EC₅₀
- a) por debajo de 10000 pM, con mayor preferencia por debajo de 5000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 4000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 3000 pM;
- 55 b) por debajo de 2000 pM, preferentemente por debajo de 1500 pM, con mayor preferencia por debajo de 1200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 1000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 500 pM;
- c) por debajo de 400 pM, preferentemente por debajo de 300 pM, con mayor preferencia por debajo de 200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM; o
- 60 d) por debajo de 80 pM, preferentemente por debajo de 60 pM, con mayor preferencia por debajo de 40 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 30 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 20 pM.
162. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la potencia se determina como EC₅₀ para la curva de dosis-respuesta que muestra la formación de cAMP de manera dependiente de la dosis en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, preferentemente mediante el uso de una línea celular transfectada estable tal
- 65

- 5 como BHK467-12A (tk-ts13), y/o mediante el uso de la determinación de cAMP de ensayo de receptor funcional, por ejemplo basado en la competencia entre el cAMP formado endógenamente y el cAMP marcado con biotina añadido exógenamente, en dicho ensayo el cAMP se captura con mayor preferencia mediante el uso de un anticuerpo específico, y/o en donde un ensayo incluso más preferido es el Ensayo de cAMP AlphaScreen, con la máxima preferencia el descrito en el ejemplo 31.
- 10 163. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, para el cual la relación [afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta), dividido por la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de HSA al 0,005 % (albúmina baja)] es:
- 15 a) al menos 1,0, con mayor preferencia al menos 10, aún con mayor preferencia al menos 25, o con la máxima preferencia al menos 50;
- b) al menos 60, preferentemente al menos 70, con mayor preferencia al menos 90, incluso con mayor preferencia al menos 80, o con la máxima preferencia al menos 100;
- 20 d) al menos 125, preferentemente al menos 150, con mayor preferencia al menos 200, aún con mayor preferencia al menos 250, incluso con mayor preferencia al menos 400, o con la máxima preferencia al menos 500; o
- d) al menos 600, preferentemente al menos 800, aún con mayor preferencia al menos 900, o con la máxima preferencia al menos 1000.
- 25 164. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de HSA al 0,005 % (albúmina baja) está
- a) por debajo de 1000 nM, preferentemente por debajo de 750 nM, con mayor preferencia por debajo de 500 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 nM; o
- 30 b) por debajo de 50,0 nM, preferentemente por debajo de 15,0 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 10,0 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 5,0 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 1,0 nM.
- 35 165. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC₅₀) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta) está
- a) por debajo de 1100 nM, preferentemente por debajo de 1000 nM, con mayor preferencia por debajo de 900 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 600 nM; o
- 40 b) por debajo de 500 nM, preferentemente por debajo de 350 nM, con mayor preferencia por debajo de 200 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 100 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 50,0 nM.
- 45 166. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide mediante el desplazamiento de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor, preferentemente mediante el uso de un ensayo de unión a SPA.
167. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el receptor de GLP-1 se prepara mediante el uso de una línea celular estable, transfectada, preferentemente una línea celular de hámster, con mayor preferencia una línea celular de riñón de hámster bebé, tal como BHK tk-ts13.
- 50 168. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el valor de IC₅₀ se determina como la concentración que desplaza el 50 % de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor.
169. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de semaglutida.
- 55 170. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la biodisponibilidad oral se mide in vivo en ratas, como exposición en plasma después de la inyección directa en el lumen intestinal.
- 60 171. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, para el cual la concentración plasmática (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de la inyección de una solución del derivado en el yeyuno de la rata, dividida por la concentración (μM) de la solución inyectada (exposición corregida para la dosis a los 30 min) es al menos 39, o al menos 40; preferentemente al menos 60; con mayor preferencia al menos 80; aún con mayor preferencia al menos 100; incluso con mayor preferencia al menos 125; o con la máxima preferencia al menos 150.
- 65 172. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, para el cual la concentración plasmática (pM) del derivado, determinada 30 minutos después de la inyección de una solución del derivado en el yeyuno de rata, dividida

ES 2 712 945 T3

por la concentración (μM) de la solución inyectada (exposición corregida por dosis a los 30 min) es al menos 160, preferentemente al menos 180, con mayor preferencia al menos 200, o con la máxima preferencia al menos 250.

- 5 173. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado de GLP-1 se analiza a una concentración de 1000 μM en una mezcla con caprato de sodio a 55 mg/ml.
174. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se usan ratas machos Sprague Dawley, preferentemente con un peso corporal a la llegada de aproximadamente 240 g.
- 10 175. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las ratas ayunan durante aproximadamente 18 horas antes del experimento.
176. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las ratas se someten a anestesia general después de haber ayunado y antes de la inyección del derivado en el yeyuno.
- 15 177. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado se administra en la parte proximal del yeyuno (10 cm distal para el duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal para el ciego), preferentemente en la parte proximal del yeyuno.
- 20 178. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde 100 μl del derivado se inyecta en el lumen del yeyuno a través de un catéter con una jeringa y posteriormente 200 μl de aire se empuja en el lumen del yeyuno con otra jeringa, que después se deja conectado al catéter para evitar el flujo de regreso en el catéter.
- 25 179. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las muestras de sangre (200 μl) se recolectan en tubos con EDTA a partir de la vena caudal a intervalos deseados, tales como en los tiempos 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min y se centrifuga durante 5 minutos, 10 000 G, a 4°C en 20 minutos.
- 30 180. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el plasma (por ejemplo, 75 μl) se separa, se congela inmediatamente y se mantiene a -20 °C hasta que se analiza la concentración plasmática del derivado.
- 35 181. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se usa el LOCI (Ensayo Luminiscente de Canalización de Oxígeno) para analizar la concentración plasmática del derivado.
182. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es eficaz a menor glucosa en sangre in vivo en ratones db/db.
- 40 183. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es eficaz en disminuir el peso corporal in vivo en ratones db/db.
- 45 184. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los ratones db/db se tratan, s.c., con un intervalo adecuado de dosis del derivado de GLP-1 y la glucosa en sangre y/o el peso corporal se determina(n) a intervalos apropiados.
- 50 185. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la dosis del derivado de GLP-1 es 0,3 nmol/kg, 1,0 nmol/kg, 3,0 nmol/kg, 10 nmol/kg, 30 nmol/kg y 100 nmol/kg, en donde kg se refiere al peso corporal del ratón.
- 55 186. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde un grupo de control se trata con vehículo, s.c., preferentemente el medio en el cual el derivado de GLP-1 se disuelve, por ejemplo con la siguiente composición: fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4.
187. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la glucosa en sangre se determina, y/o los ratones se pesan, en un tiempo de -1/2h (media hora antes de la dosificación (t=0)) y en los tiempos 1, 2, 4 y 8h.
- 60 188. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de glucosa se mide mediante el uso del método de la glucosa oxidasa.
189. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
- (i) ED_{50} (peso corporal (BW)) se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre delta BW (por ejemplo, disminuye) 8 horas después de la administración subcutánea del derivado; y/o
- (ii) ED_{50} (la glucosa en sangre (BG)) se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre AUC (Área Bajo la Curva) de delta BG (por ejemplo, disminuye) 8 horas y/o 24 horas después de la administración subcutánea del derivado.
- 65

ES 2 712 945 T3

190. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde existe relación sigmoidal de respuesta a dosis, preferentemente con una clara definición de la respuesta máxima.
- 5 191. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene un perfil de acción más prolongado que liraglutida.
192. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la prolongación significa vida media in vivo en especies relevantes de animales, tales como ratones db/db, rata, cerdo y/o, preferentemente, minicerdo; en donde el
10 derivado se administra i) s.c. y/o ii) i.v.; preferentemente ii) i.v.
193. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la vida media terminal ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. en minicerdos es
- 15 a) al menos 12 horas, preferentemente al menos 24 horas, con mayor preferencia al menos 36 horas, incluso con mayor preferencia al menos 48 horas, o con la máxima preferencia al menos 60 horas;
- b) al menos 7 horas, preferentemente al menos 16 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, incluso con
20 mayor preferencia al menos 30 horas, o con la máxima preferencia al menos 40 horas;
- c) al menos 50 horas, preferentemente al menos 60 horas, con mayor preferencia al menos 70 horas, incluso con mayor preferencia al menos 80 horas, o con la máxima preferencia al menos 90 horas.
- 25 194. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos son minicerdos machos Göttingen.
195. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos tienen 7-14 meses de edad y pesan, preferentemente, de 16-35 kg.
- 30 196. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos se alojan individualmente y se alimentan una o dos veces al día, preferentemente con dieta para minicerdo SDS.
197. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado se dosifica, i.v., después de al
35 menos 2 semanas de aclimatación.
198. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los animales se someten a ayuno durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y durante al menos 4 h después de la dosificación y tienen acceso ad libitum al agua durante todo el período.
- 40 199. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado de GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración adecuada, preferentemente de 20-60 nmol/ml.
- 45 200. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde inyecciones intravenosas del derivado se dan en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.
201. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa en minicerdos.
- 50 202. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos son minicerdos machos Göttingen.
203. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos tienen 7-14 meses de edad.
- 55 204. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los minicerdos se alojan en corrales individuales y se alimentan una o dos veces al día, preferentemente con dieta para minicerdos SDS.
205. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde una dosis única, opcionalmente después de un periodo con escalado de dosis, se administra por vía i.v., o s.c., en la piel delgada detrás de la oreja.
60
206. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los animales ayunan durante aproximadamente 18 horas antes de la dosificación.
- 65 207. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se analizan un grupo de referencia y una serie de grupos con dosis del derivado correspondientes a 2-6 niveles diferentes de concentraciones plasmáticas, en donde el grupo de referencia es a) tratado con vehículo, o b) no tratado.

208. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el nivel de concentración plasmática es 3000-80000 pM.
- 5 209. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se realiza una prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa a la 1o 2 horas (IVGTT).
210. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se administra glucosa a 0,3 g/kg i.v. durante un periodo de 30 segundos, y se toman muestras de sangre en puntos de tiempo adecuados, tal como los siguientes puntos de tiempo (t=0 corresponde al bolo de glucosa): -10, -5, 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 minutos.
- 10 211. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se determina la concentración en plasma del derivado, glucosa e insulina.
- 15 212. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración del derivado se mide en t= 0 min, y, opcionalmente, al final de la prueba (t=60 min, o t=120 min).
- 20 213. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de glucosa se analiza mediante el uso del método de la glucosa oxidasa.
214. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se calcula el área bajo la curva de insulina (AUCinsulina) y se usa como una medida de secreción de insulina.
- 25 215. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde para al menos una concentración de estas, el AUCinsulina es mayor que el AUCinsulina de referencia, preferentemente al menos 110 % de este, con mayor preferencia al menos 120 % de este, incluso con mayor preferencia al menos 130 % de este o con mayor preferencia al menos 140 % de este.
- 30 216. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que provoca una reducción de la ingesta de alimentos en cerdos respecto a un control (preferentemente tratado con vehículo, o no tratado);
- opcionalmente la ingesta de alimentos (0-24 horas) puede ser 90 % o menor respecto al control tratado con vehículo, preferentemente 80 % o menor, con mayor preferencia 70 % o menor, incluso con mayor preferencia 60 % o menor, o con la máxima preferencia 50 % o menor;
- 35 en donde la ingesta de alimentos (0-24 horas) se refiere a las primeras 24 horas después de la administración del derivado o vehículo.
- 40 217. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los cerdos son cerdos Landrace Yorkshire Duroc (LYD) hembras.
218. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los cerdos tienen 3 meses de edad, y preferentemente tienen un peso de 30-35 kg.
- 45 219. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los animales se alojan en un grupo durante 1-2 semanas para la adaptación.
220. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde durante el período experimental, los animales se colocan en corrales individuales desde el lunes por la mañana hasta el viernes por la tarde para la medición de la ingesta de alimentos individuales.
- 50 221. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los animales se alimentan ad libitum con pienso de cerdo (tal como Svinefoder, Antonio).
- 55 222. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la ingesta de alimentos se monitorea en línea mediante el registro del peso del pienso cada 15 minutos, preferentemente mediante el uso del sistema Mpigwin.
223. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, cuya dosificación es 0,3, 1,0, 3,0, 10, o 30 nmol/kg, preferentemente disuelto en un tampón de fosfato (fosfato 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 8), con mayor preferencia a concentraciones de 12, 40, 120, 400, o 1200 nmol/ml.
- 60 224. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el tampón de fosfato sirve como vehículo.
225. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde los animales se dosificaron con una sola dosis subcutánea del derivado o vehículo (preferentemente con un volumen de dosis de 0,025 ml/kg) en la mañana del día 1 y la ingesta de alimentos se midió durante 4 días después de la dosificación.
- 65

226. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de al menos 4 horas, preferentemente al menos 6 horas, incluso con mayor preferencia al menos 8 horas, o con mayor preferencia al menos 10 horas.

227. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de al menos 12 horas, preferentemente al menos 15 horas, incluso con mayor preferencia al menos 18 horas, o con la máxima preferencia al menos 20 horas.

228. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene un tiempo de vida media ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. de al menos 24 horas, preferentemente al menos 26 horas, o con la máxima preferencia al menos 30 horas.

229. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las ratas son ratas Sprague Dawley de sexo masculino con un peso corporal de aproximadamente 400 g.

230. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 38Q; y/o (ii) 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

231. El análogo de GLP-1 de la modalidad 230 que comprende (38E, 39G).

232. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que preferentemente tiene los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K; (ii) 22E, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E, 39G; (iii) 22E, 26R, 27K, 34R, 36K, des37; (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K; (v) 8Aib, 20K, 22E, 26R, 27K, 30E, 34G, des35-37; (vi) 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (vii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (viii) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des35-37; (ix) 8Aib, 22K, 25V, 26R, 27K, 34R, des36-37; (x) 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xi) 22K, 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q; (xii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34R, 36K, 38Q; (xiii) 25V, 26R, 27K, 30E, 34Q, 36K, 38E; (xiv) 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; (xviii) 8Aib, 12K, 22E, 26R, 27K, 31H, 34Q; (xix) 8Aib, 22K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xx) 22E, 26H, 27K, 30E, 34R, 36K, 38E; (xxi) 22E, 24K, 26R, 27K, 31H, 34G, des35-37; (xxii) 25V, 26R, 27K, 34Q, 36K; (xxiii) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34R; (xxiv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34G, des35-37; (xxv) 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 34R; o (xxvi) 8Aib, 22E, 24K, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de este.

233. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, para el uso como un medicamento.

234. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.

235. Un método para tratar o evitar todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- β , y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética - mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores.

Las siguientes son todavía otras modalidades particulares descritas en la presente:

1. Un derivado de un análogo de GLP-1,

dicho análogo comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición T de GLP-1(7-37), donde T es un número entero en el intervalo de 7-37 excepto 18 y 27; y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K^{27} , y el segundo residuo K se designa K^T ; dicho derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a K^{27} y K^T , respectivamente, por medio de un enlazador, en donde

la porción de prolongación se selecciona del Químico 1 y el Químico 2:

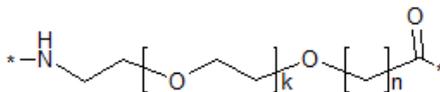


ES 2 712 945 T3

en donde x es un número entero en el intervalo de 6-18 y "y" es un número entero en el intervalo de 3-17; y el enlazador comprende el Químico 5:

Químico 5:

5



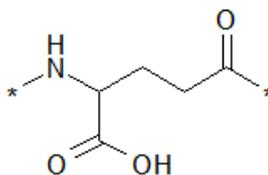
10 en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 1-5;

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

15 2. El derivado de la modalidad 1, en donde el enlazador comprende además un dirradical Glu seleccionado del Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:

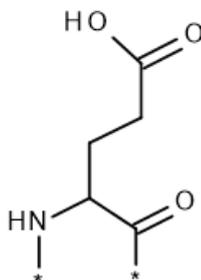
20



25

Químico 7:

30



35

40

3. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.

45 4. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde T es 12, 20, 22, 24, 36, o 37.

5. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo no comprende residuos de K distintos del primer y el segundo residuo de K.

50 6. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde x es 12.

7. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde y es 9.

55 8. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde k es 1.

9. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde n es 1.

10. El derivado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el análogo comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I:

60

Fórmula I:

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Xaa12-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Xaa26-Lys-Phe-Ile-Xaa30-Xaa31-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37-Xaa38-Xaa39,

65

en donde

- Xaa₇ es L-histidina, imidazopropionilo, α -hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N^o-acetil-histidina, N^o-formil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- 5 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- 10 Xaa₁₂ es Lys o Phe;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Arg, Asn, Gln, o Glu;
- 15 Xaa₁₉ es Tyr o Gln;
- Xaa₂₀ es Leu, Lys, o Met;
- 20 Xaa₂₂ es Gly, Glu, Lys, o Aib;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala o Lys;
- 25 Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₆ es Val, His, o Arg;
- 30 Xaa₃₀ es Ala, Glu, o Arg;
- Xaa₃₁ es Trp o His;
- Xaa₃₄ es Glu, Asn, Gly, Gln, o Arg;
- 35 Xaa₃₅ es Gly, Aib, o ausente;
- Xaa₃₆ es Arg, Gly, Lys, o ausente;
- 40 Xaa₃₇ es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, Arg, o está ausente;
- Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Gln, Pro, Arg, o está ausente; y
- Xaa₃₉ es Gly o ausente.
- 45 11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, seleccionado de los siguientes: Chem. 50, Químico 51, Químico 52, Químico 53, Químico 54, Químico 55, Químico 56, Químico 57, Químico 58, Químico 59, Químico 60, Químico 61, Químico 62, Químico 63, Químico 64, Químico 65, Químico 66, Químico 67, Químico 68, Químico 69, Químico 70, Químico 71, Químico 72, Químico 73, Químico 74, Químico 75, Químico 76, Químico 77, Químico 78 y Químico 79; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 50 12. Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1): (i) 38Q; y/o (ii) 39G; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 55 13. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-11, para el uso como un medicamento.
14. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-11, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.
- 60 15. Un método para tratar o evitar todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función
- 65

de las células- β , y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética - mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-11.

EJEMPLOS

5 Esta parte experimental comienza con una lista de abreviaturas y le continúa una sección que incluye los métodos generales para sintetizar y caracterizar los análogos y derivados de la invención. Después le continúa una serie de ejemplos que se relacionan con la preparación de derivados de GLP-1 específicos y al final se ha incluido una serie de ejemplos relacionados con la actividad y las propiedades de estos análogos y derivados (sección titulada métodos farmacológicos).

Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Abreviaturas

15 Las siguientes abreviaturas se usan en lo siguiente, en orden alfabético:

Aib:	ácido aminoisobutírico (ácido α -aminoisobutírico)
20 API:	Ingrediente farmacéutico activo
AUC:	Área bajo la curva
BG:	Glucosa en sangre
25 BHK	Riñón de Hámster Bebé
BW:	Peso Corporal
30 Boc:	<i>t</i> -butiloxicarbonilo
BSA:	Albúmina sérica bovina
colidina:	2,4,6-trimetilpiridina
35 DCM:	diclorometano
Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
40 DIC:	diisopropilcarbodiimida
DIPEA:	diisopropiletilamina
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
45 DMEM:	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)
EDTA:	ácido etilendiaminatetraacético
EGTA:	ácido etilen glicol tetraacético
50 FCS:	Suero de Ternera Fetal
Fmoc:	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
55 HATU:	(O-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HBTU:	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
60 HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol o hexafluoroisopropanol
HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
65 HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
HPLC:	Cromatografía Líquida de alto rendimiento

	HSA:	Albúmina sérica humana
5	IBMX:	3-isobutil-1-metilxantina
	Imp: i.v.	Ácido imidazopropiónico (también denominado como des-amino histidina, DesH) por vía intravenosa
10	ivDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
	IVGTT:	Prueba de Tolerancia a Glucosa Intravenosa
	LCMS:	Cromatografía Líquida Espectroscopía de masas
15	LYD:	Landrace Yorkshire Duroc
	MALDI-MS:	Ver MALDI-TOF MS
20	MALDI-TOF MS:	Espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de Desorción/Ionización láser asistida por matriz
	MeOH:	metanol
	Mmt:	4-metoxitritilo
25	Mtt:	4-metiltritilo
	NMP:	N-metil pirrolidona
30	OBz:	éster de benzoilo
	OEG:	ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico
	OtBu:	éster terc butílico
35	PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
	PD:	Farmacodinámica
40	Pen/Strep:	Penicilina/Estreptomicina
	PK:	Farmacocinética
	RP:	Fase inversa
45	RP-HPLC:	Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase inversa
	RT:	Temperatura ambiente
50	RT:	Tiempo de retención
	s.c.:	Vía subcutánea
	SD:	Desviación estándar
55	SEC-HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión de Tamaño
	SEM:	Error estándar de la media
60	SPA:	Ensayo de Proximidad por Centelleo
	SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
	tBu:	terc butilo
65	TFA:	ácido trifluoroacético
	TIS:	triisopropilsilano

Tris: tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Trt: trifenilmetilo o tritilo

Trx: ácido tranexámico

UPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento

10 Métodos de preparación

A. Métodos generales

15 Esta sección se refiere a métodos para la síntesis de péptidos en fase sólida (métodos SPPS, que incluyen métodos para la desprotección de aminoácidos, métodos para escindir el péptido de la resina y para su purificación), así como también métodos para detectar y caracterizar el péptido resultante (métodos de LCMS, MALDI y UPLC). La síntesis de los péptidos en fase sólida puede mejorarse en algunos casos mediante el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que puede escindirse en condiciones ácidas tales como, pero sin limitarse a, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, pueden usarse dipéptidos de pseudoprolina (disponibles de, por ejemplo, Novobiochem, ver además W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403). Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec, IRIS, o Novabiochem). El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ejemplo, se usó Boc-His(Boc)-OH, o Boc-His(Trt)-OH para los péptidos con His en el N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en la secuencia se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta para la unión de la porción de unión a la albúmina y el espaciador. La porción de unión a la albúmina y/o el enlazador pueden unirse al péptido ya sea mediante acilación del péptido unido a una resina o mediante acilación en solución del péptido no protegido. En caso de unión de la porción de unión a albúmina y/o el enlazador a la resina peptidil protegida, la unión puede ser modular mediante el uso de SPPS y bloques constitutivos protegidos adecuadamente tal como pero sin limitarse a Fmoc-Oeg-OH (ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico), Fmoc-Trx-OH (Fmoc-ácido tranexámico), Fmoc-Glu-OtBu, éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico, éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico, o éster terc-butílico del ácido 4-(9-carboxinonilo)benzoico.

1. Síntesis del péptido unido a una resina

35 Método SPPS B

El método SPPS B se refiere a la síntesis de una resina peptidil protegida mediante el uso de química Fmoc en un sintetizador de péptidos Liberty basado en microondas (CEM Corp., Carolina del Norte). Una resina adecuada es una resina Wang pre-cargada, de carga baja, disponible de Novabiochem (por ejemplo Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja, 0,35 mmol/g). La desprotección del Fmoc fue con piperidina al 5 % en NMP hasta 70 o 75 °C. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP. Las soluciones de aminoácido/HOAt (0,3 M en NMP a un exceso molar de 3-10 veces) se añadieron a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (0,75 M en NMP). Por ejemplo, se usaron las siguientes cantidades de solución de aminoácido/HOAt 0,3 M por acoplamiento para las siguientes reacciones en escala: Escala/ml, 0,10 mmol/2,5 ml, 0,25 mmol/5 ml, 1 mmol/15 ml. Los tiempos y las temperaturas de acoplamiento fueron generalmente de 5 minutos a hasta 70 °C o 75 °C. Tiempos de acoplamiento más largos se usaron para reacciones a mayor escala, por ejemplo, 10 min. Los aminoácidos histidina estaban doble acoplados a 50 °C, o acoplados cuatro veces si el aminoácido anterior estaba estéricamente impedido (por ejemplo, Aib). Los aminoácidos arginina se acoplaron a RT durante 25 min después se calentaron a 70 °C o 75 °C durante 5 min. Algunos aminoácidos, tales como, pero sin limitarse a Aib, estaban "doble acoplados", lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 5 minutos a 75 °C), la resina se drena y se añaden más reactivos (aminoácidos, HOAt y DIC) y la mezcla se calienta de nuevo (por ejemplo, 5 minutos a 75 °C). Cuando se deseó una modificación química de una cadena lateral de lisina, la lisina se incorporó como Lys(Mtt). El grupo Mtt se eliminó mediante lavado de la resina con DCM y suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol puro (no diluido) durante 20 minutos seguido por lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó lo mismo mediante síntesis manual (véase el método SPPS D) o mediante una o más etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Liberty como se describió anteriormente, mediante el uso de bloques constitutivos protegidos adecuadamente (véase Métodos generales), que incluye opcionalmente un acoplamiento manual.

60 Método SPPS D

El método SPPS D se refiere a la síntesis de la resina peptidil protegida mediante el uso de química manual de Fmoc. Esto se usó típicamente para la unión de los enlazadores y las cadenas laterales a la cadena principal del péptido. Las siguientes condiciones se emplearon a una escala de síntesis de 0,25 mmol. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt/colidina en NMP a un exceso molar de 4-10 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron 1-6 h a temperatura ambiente. La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20-25 % en NMP (3 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml). La desprotección de Dde o ivDde se realizó con hidrazina al 2 % en

5 NMP (2 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml). La desprotección de Mtt o Mmt se realizó con TFA al 2 % y TIS al 2-3 % en DCM (5 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con DCM (2 x 20 ml), MeOH al 10 % y DIPEA al 5 % en DCM (2 x 20 ml) y NMP (4 x 20 ml), o mediante el tratamiento con hexafluoroisopropanol puro (5 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados como lo anterior. La porción de unión a albúmina y/o el enlazador pueden unirse al péptido ya sea mediante acilación del péptido unido a la resina o mediante acilación en solución del péptido no protegido (ver las rutas descritas más adelante). En el caso de unión de la porción de unión a la albúmina y/o el enlazador a la resina peptidil protegida la unión puede ser modular mediante el uso de SPPS y bloques constitutivos protegidos adecuadamente (véase Métodos generales).

10 Unión al péptido unido a la resina: Ruta I: Una porción de unión a la albúmina (éster activo o anhídrido simétrico) activada o enlazador tal como éster mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) del ácido octadecanodioico (Ebashi y otros, EP511600, 4 equivalentes molares relativos al péptido unido a la resina) se disolvió en NMP (25 ml), se añadió a la resina y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó exhaustivamente con NMP, DCM, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

15 Unión al péptido unido a la resina: Ruta II: La porción de unión a la albúmina se disolvió en NMP/DCM (1:1, 10 ml). Se añadió el reactivo de activación tal como HOBT (4 equivalentes molares con relación a la resina) y DIC (4 equivalentes molares con relación a la resina) y la solución se agitó durante 15 minutos. La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares con relación a la resina). La resina se agitó de 2 a 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2 x 20 ml), NMP/DCM (1:1, 2 x 20ml) y DCM (2 x 20 ml).

20 Unión al péptido en solución: Ruta III: La porción de unión a la albúmina (éster activo o anhídrido simétrico) activada o el enlazador tal como éster mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) del ácido octadecanodioico (Ebashi y otros, EP511600) 1-1,5 equivalentes molares en relación con el péptido se disolvió en un disolvente orgánico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mezcla de agua/disolvente orgánico (1-2 ml) y se añadió a una solución del péptido en agua (10-20 ml) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de grupos protectores en el residuo de unión a la albúmina tal como *terc*-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó durante toda la noche y el péptido bruto aislado se desprotegió después. En el caso de los grupos de protección *terc*-butilo la desprotección se realizó disolviendo el péptido en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y trisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 minutos, la mezcla se evaporó *al vacío* y el péptido en bruto se purificó mediante HPLC preparativa como se describe después.

Método SPPS E

35 El método SPPS E se refiere a la síntesis de péptidos mediante química Fmoc en un Sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 Estados Unidos). Una resina adecuada es una resina Wang pre-cargada, de carga baja, disponible de Novabiochem (por ejemplo fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang de carga baja, 0,35 mmol/g). La desprotección del Fmoc fue con piperidina al 25 % en NMP durante 2 x 10 min. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt/colidina en NMP. Las soluciones de aminoácido/HOAt (0,3 M en NMP a un exceso molar de 3-10 veces) se añadieron a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) y colidina (3 M en NMP). Por ejemplo, se usaron las siguientes cantidades de solución de aminoácido/HOAt 0,3 M por acoplamiento para las siguientes reacciones en escala: Escala/ml, 0,10 mmol/2,5 ml, 0,25 mmol/5 ml. Los tiempos de acoplamiento fueron generalmente de 60 minutos. Algunos aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a arginina, Aib o histidina se "acoplaron doblemente", lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 60 min), la resina se drena y se añaden más reactivos (aminoácido, HOAt, DIC y colidina) y la mezcla se deja reaccionar de nuevo (por ejemplo, 60 minutos). Algunos aminoácidos y derivados de ácidos grasos que incluyen pero sin limitarse a Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Trx-OH, Fmoc-Glu-OtBu, éster mono-*terc*-butílico del ácido octadecanodioico, éster mono-*terc*-butílico del ácido nonadecanodioico, o éster *terc*-butílico del ácido 4-(9-carboxinilo) benzoico se acoplaron durante un tiempo prolongado, por ejemplo 6 horas. Cuando se deseó una modificación química de una cadena lateral de lisina, la lisina se incorporó como Lys(Mtt). El grupo Mtt se eliminó mediante lavado de la resina con DCM y suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol/DCM (75:25) durante 3 x 10 minutos seguido por lavados con DCM, piperidina al 20 % y NMP. La modificación química de la lisina se realizó lo mismo mediante síntesis manual (véase método SPPS D) o mediante una o más etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Prelude como se describió anteriormente mediante el uso de bloques constitutivos protegidos adecuadamente (véase Métodos generales).

55 2. Escisión del péptido a partir de la resina y purificación

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

3. Métodos para la detección y caracterización

65 Métodos de LCMS Método LCMS 1 (LCMS1)

ES 2 712 945 T3

Se usó un espectrómetro de masas LC/MSD TOF de Agilent Technologies (G1969A) para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC Agilent serie 1200. La desconvolución de los espectros de proteínas se calculó con el programa informático de confirmación de proteínas de Agilent.

5 Eluyentes:

A: Ácido trifluoro acético al 0,1 % en agua

B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo

10 Columna: Zorbax 5u, 300SB-C3, 4,8x50mm

Gradiente: acetonitrilo al 25 % - 95 % durante 15 min

Método LCMS 2 (LCMS2)

15 Se usó un espectrómetro de masas Sciex API 3000 de Perkin Elmer para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC de Perkin Elmer Series 200.

Eluyentes:

20

A: Ácido trifluoro acético al 0,05 % en agua

B: Ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo

25 Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm

Gradiente: acetonitrilo al 5 % - 90 % durante 7,5 min a 1,5 ml/min

Método LCMS 3 (LCMS3)

30

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

Eluyentes:

35

A: Ácido trifluoro acético al 0,1 % en agua

B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo

40 Columna: Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4,60 mm id 5 µm

Gradiente: 10 % - 90 % B durante 7,5 min a 1,0 ml/min

Método LCMS 4 (LCMS4)

45

LCMS_4 se realizó en una configuración que consistía en el sistema Waters Acquity UPLC y el espectrómetro de masas LCT Premier XE de Micromass. La bomba UPLC se conectó a dos recipientes de elución que contenían:

A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua

50

B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo

El análisis se realizó a RT mediante inyección de un volumen adecuado de la muestra (preferentemente 2-10 µl) sobre la columna que se eluyó con un gradiente de A y B.

55

Las condiciones de UPLC, las configuraciones del detector y las configuraciones del espectrómetro de masa fueron:

Columna: UPLC Waters Acquity BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm

60 Gradiente: Acetonitrilo al 5 % - 95 % lineal durante 4,0 min (alternativamente 8,0 min) a 0,4 ml/min

Detección: 214 nm (salida analógica del TUV (detector de UV sintonizable))

Modo de ionización de MS: API-ES

65

Escáner: 100-2000 amu (alternativamente 500-2000 amu), paso 0,1 amu

Métodos de UPLC y HPLC

Método 05_B5_1

5 UPLC (método 05_B5_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

10 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10% CH₃CN (pH 3,5)

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

15 Se usó el siguiente gradiente lineal: 60 % A, 40 % B a 30 % A, 70 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 05_B7_1

20 UPLC (Método 05_B7_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

25 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10% CH₃CN (pH 3,5)

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

30 Se usó el siguiente gradiente lineal: 80 % A, 20 % B a 40 % A, 60 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 04_A2_1

35 UPLC (Método 04_A2_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

40 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0,25 M bicarbonato de amonio

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

45 Se usó el siguiente gradiente lineal: 90 % A, 10 % B a 60 % A, 40 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 04_A3_1

50 UPLC (Método 04_A3_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

55 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0,25 M bicarbonato de amonio

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

60 Se usó el siguiente gradiente lineal: 75 % A, 25 % B a 45 % A, 55 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 04_A4_1

65

ES 2 712 945 T3

UPLC (Método 04_A4_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

5 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0,25 M bicarbonato de amonio

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

10 Se usó el siguiente gradiente lineal: 65 % A, 35 % B a 25 % A, 65 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 08_B2_1

15 UPLC (Método 08_B2_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

20 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA

B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA

25 Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 40 % A, 60 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 08_B4_1

30 UPLC (Método 08_B4_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

35 El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA

B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA

40 Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 95 % A, 5 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 05_B10_1

45 UPLC (Método 05_B10_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40°C.

El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

50 A: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10% CH₃CN (pH 3,5)

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

55 Se usó el siguiente gradiente lineal: 40 % A, 60 % B a 20 % A, 80 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 01_A4_2

60 UPLC (Método 01_A4_2): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Waters 600S equipado con un detector de matriz de diodos Waters 996. Las detecciones de UV a 214 nm y 254 nm se registraron mediante el uso de una columna Symmetry300 C18, 5 µm, 3,9 mm x 150 mm, 42°C. El sistema HPLC se conectó a tres recipientes de elución que contenían: A: 100 % H₂O, B: 100 % CH₃CN, C: ácido trifluoroacético al 1 % en H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 90 % A, 5 % B, 5 % C a 0 % A, 95 % B, 5 % C durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min.

65

ES 2 712 945 T3

Método 09_B2_1

5 UPLC (Método 09_B2_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 40 % A, 60 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 09_B4_1

10 UPLC (Método 09_B4_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 05_B8_1

20 UPLC (Método 05_B8_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10%CH₃CN (pH 3,5); B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 50 % A, 50 % B a 20 % A, 80 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 10_B14_1

25 UPLC (Método 10_B14_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 50°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 70 % A, 30 % B a 40 % A, 60 % B durante 12 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 04_A6_1

35 UPLC (Método 04_A6_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 10 mM TRIS, 15 mM sulfato de amonio, 80 % H₂O, 20 %, pH 7,3; B: 80 % CH₃CN, 20 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 10 % A, 90 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,35 ml/min.

40

Método 01_B4_1

45 HPLC (Método 01_B4_1): El análisis de RP se realizó mediante el uso de un sistema Waters 600S equipado con un detector de matriz de diodos Waters 996. Las detecciones de UV se registraron mediante el uso de una columna Waters 3 mm x 150 mm 3,5 um C-18 Symmetry. La columna se calentó a 42°C y se eluyó con un gradiente lineal de 5-95 % acetonitrilo, 90-0 % agua, y 5 % ácido trifluoroacético (1,0 %) en agua durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Método 04_A7_1

50 UPLC (Método 04_A7_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 10 mM TRIS, 15 mM sulfato de amonio, 80 % H₂O, 20 %, pH 7,3; B: 80 % CH₃CN, 20 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 40 % A, 60 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

55

Método 05_B9_1

60 UPLC (Método 05_B9_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10 %CH₃CN (pH 3,5); B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 70 % A, 30 % B a 20 % A, 80 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 10_B12_1

65

UPLC (Método 10_B12_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, 1,7 μ m, 2,1 mm x 150 mm, 50°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 50 % A, 50 % B a 0 % A, 100 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método 04_A9_1

UPLC (Método 04_A9_1): El análisis RP se llevó a cabo usando un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron usando una columna ACQUITY UPLC BEH ShieldRP18, C18, 1,7 μ m, 2,1 mm x 150 mm, 60°C. El sistema HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 200 mM Na₂SO₄ + 20 mM Na₂HPO₄ + 20mM NaH₂PO₄ in 90%H₂O / 10%CH₃CN, pH 7,2; B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente por etapas: 90 % A, 10 % B a 80 % A, 20 % B durante 3 minutos, 80 % A, 20 % B a 50 % A, 50 % B durante 17 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método MALDI-MS

Los pesos moleculares se determinaron mediante el uso de espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de ionización y desorción con láser asistida por matriz (MALDI-MS) y se registraron en un Microflex o Autoflex (Bruker). Se usó una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinámico.

Método de NMR

Los espectros de NMR de protones se registraron mediante el uso de un instrumento Bruker Avance DPX 300 (300 MHz) con tetrametilsilano como un patrón interno. Los cambios químicos (δ) se dan en ppm y los patrones de división se designan de la siguiente manera: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; dt, doble triplete t, triplete, tt, triplete de tripletes; q, cuatriplete; quinteto, quintuplete; sexteto, sextuplete; m, multiplete, y br = amplio.

B. Síntesis de intermedios

1. Síntesis de mono ésteres de diácidos grasos

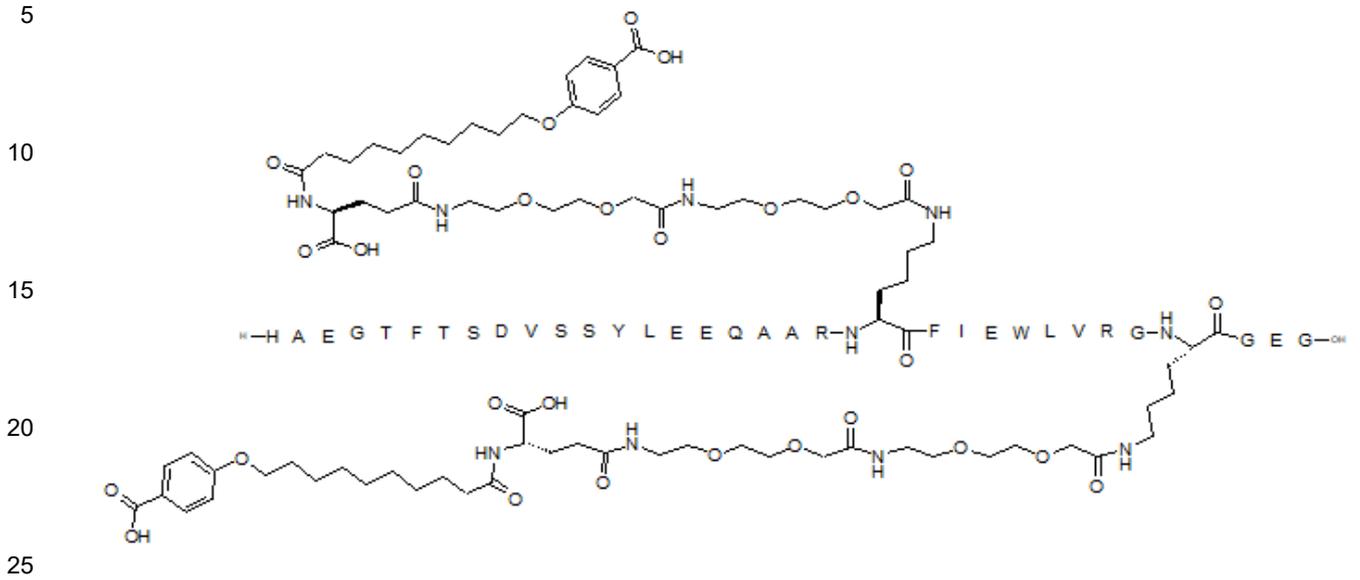
El reflujo durante toda la noche de los diácidos C12, C14, C16 y C18 con Boc-anhídrido DMAP y *t*-butanol en tolueno da predominantemente el monoéster de *t*-butilo. Se obtiene después del tratamiento una mezcla de monoácido, diácido y diéster. La purificación se lleva a cabo mediante lavado, filtración de sílice de tapón corto y cristalización.

B. Síntesis de los compuestos de la invención

Ejemplo 1

N^ε²⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N^ε³⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido

Químico 51:



Método de preparación: Método SPPS B

30 UPLC (Método 09_B2_1): Rt = 13,1 min

UPLC (Método 04_A7_1): Rt = 6,3 min

35 LCMS4: Rt = 2,1 min, m/z = 1707 (m/3), 1280 (m/4), 1025 (m/5)

Ejemplo 3

40 $N^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁶],des-Gly37-GLP-1-(7-36)-péptido

45

50

55

60

65

Químico 53:

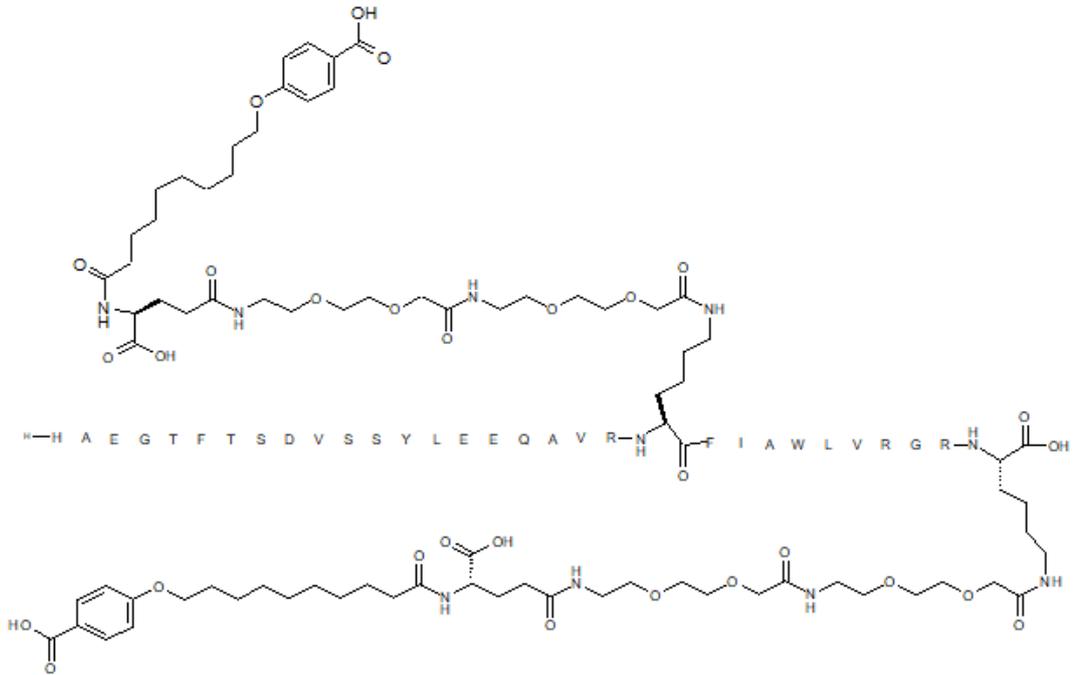
5

10

15

20

25



30 Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B2_1): Rt = 13,0 min

UPLC (Método 04_A7_1): Rt = 6,9 min

35

LCMS4: Rt = 2,0 min, m/z = 1668 (m/3), 1251 (m/4), 1001 (m/5)

Ejemplo 5

40 N_{ϵ}^{20} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys²⁰,Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

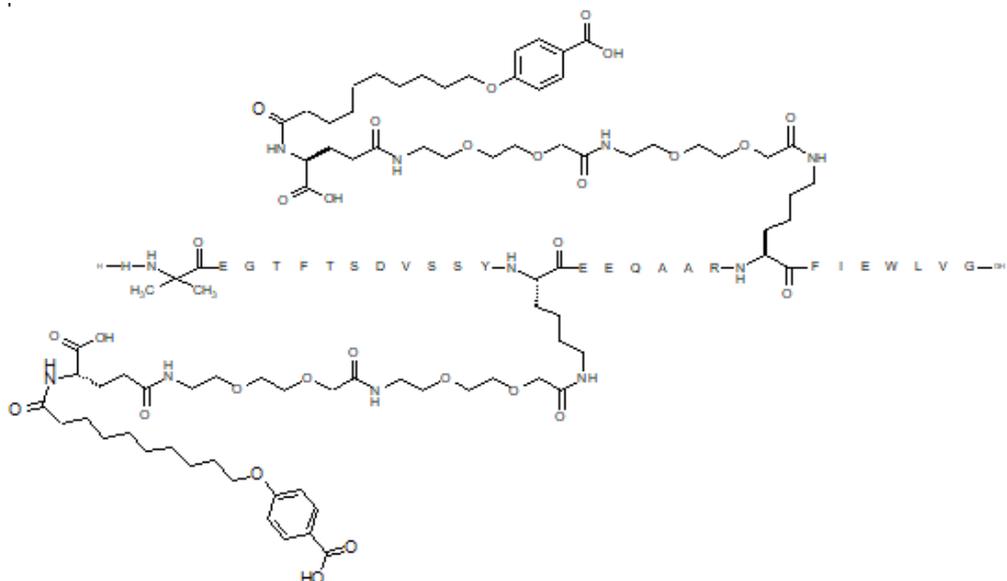
45 Químico 54:

50

55

60

65



Método de preparación: Método SPPS B

5 UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 9,02 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 4,61 min

LCMS4: Rt = 2,17 min, m/z = 1540 (m/3), 1155 (m/4)

10

Ejemplo 6

15 N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{36} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Arg³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu

Químico 55:

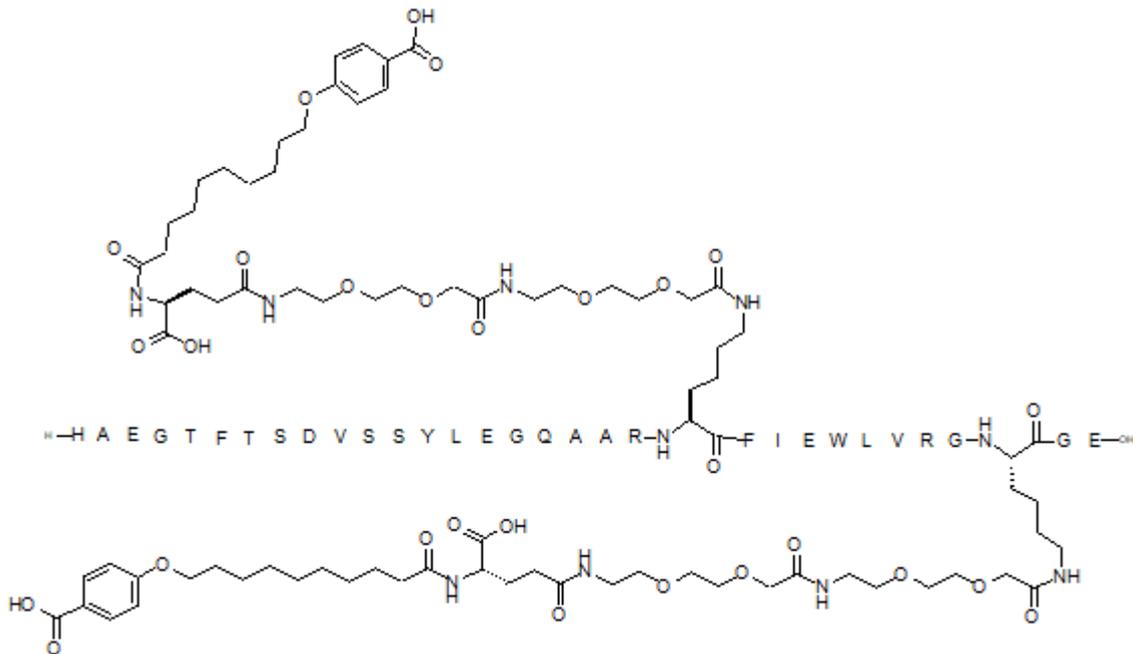
20

25

30

35

40



45 Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B2_1): Rt = 13,0 min

UPLC (Método 05_B5_1): Rt = 5,6 min

50 LCMS4: Rt = 2,2 min, m/z = 1664 (m/3), 1248 (m/4), 999 (m/5)

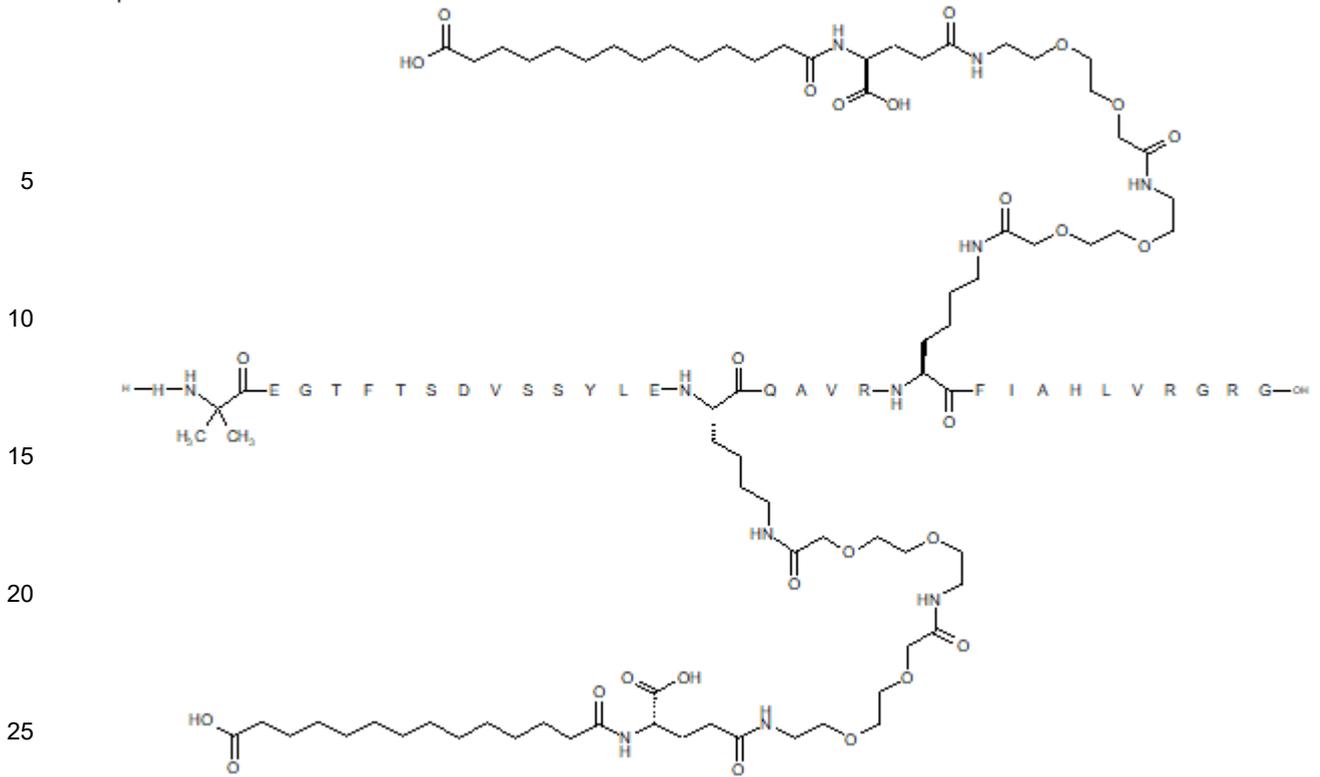
Ejemplo 7

55 N_{ϵ}^{22} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

Químico 56:

60

65



Método de preparación: Método SPPS B

LCMS2: Rt = 4,00 min, m/z = 1599 (m/3), 1199 (m/4)

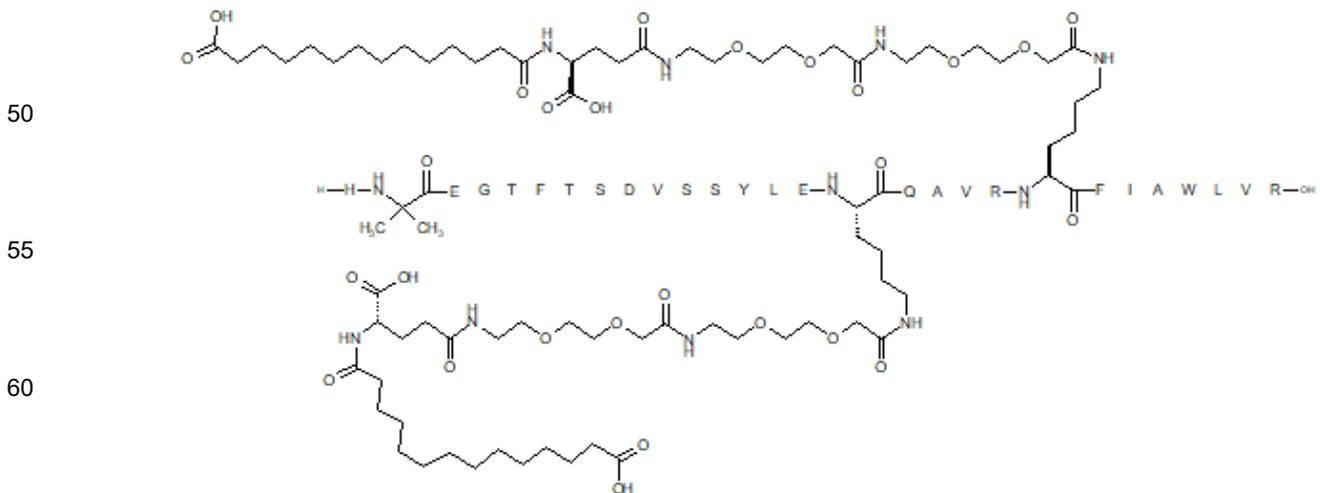
UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 7,83 min

UPLC (Método 05_B9_1): Rt = 7,45 min

Ejemplo 8

N_{ϵ}^{22} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

Químico 57:



Método de preparación: Método SPPS B

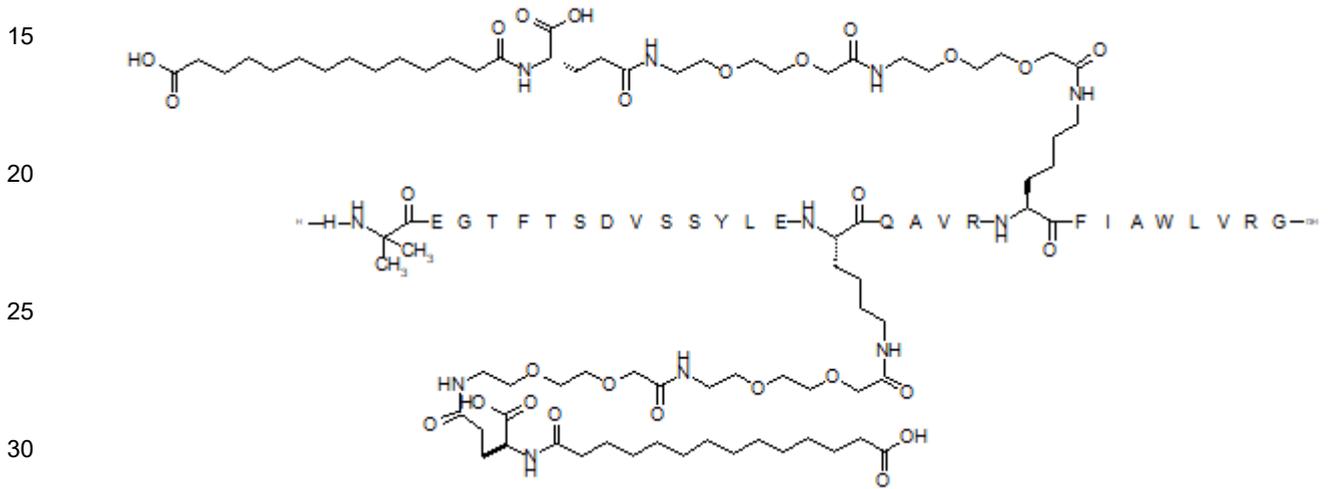
UPLC (Método 10_B12_1): Rt = 8,92 min

LCMS4: Rt = 2,58 min, m/z = 1525 (m/3), 1144 (m/4), 915 (m/5)

5 Ejemplo 9

N^ε²²-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N^ε²⁷-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴]-GLP-1-(7-35)-péptido

Químico 58:



Método de preparación: Método SPSS E

35 La masa molecular teórica de 4628 Da se confirmó por MALDI-MS

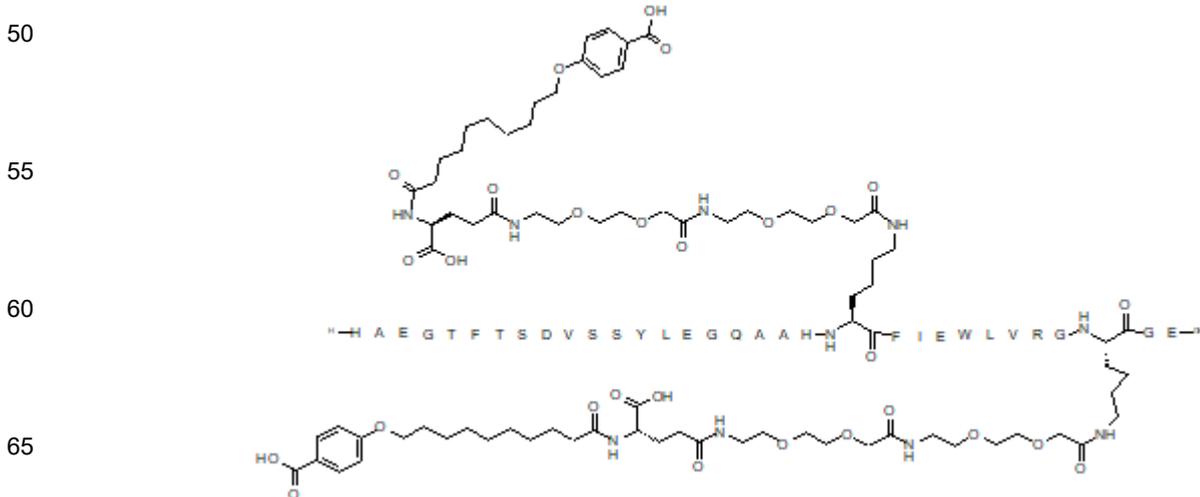
UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 9,29 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 6,49 min

40 Ejemplo 10

N^ε²⁷-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N^ε³⁶-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Arg³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu

Químico 59:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 08_B2_1): Rt = 12,9 min

5

UPLC (Método 05_B5_1): Rt = 5,5 min

LCMS4: Rt = 2,2 min, m/z = 1657 (m/3), 1243 (m/4), 995 (m/5)

10 Ejemplo 11

$N\epsilon^{22}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

15

Químico 60:

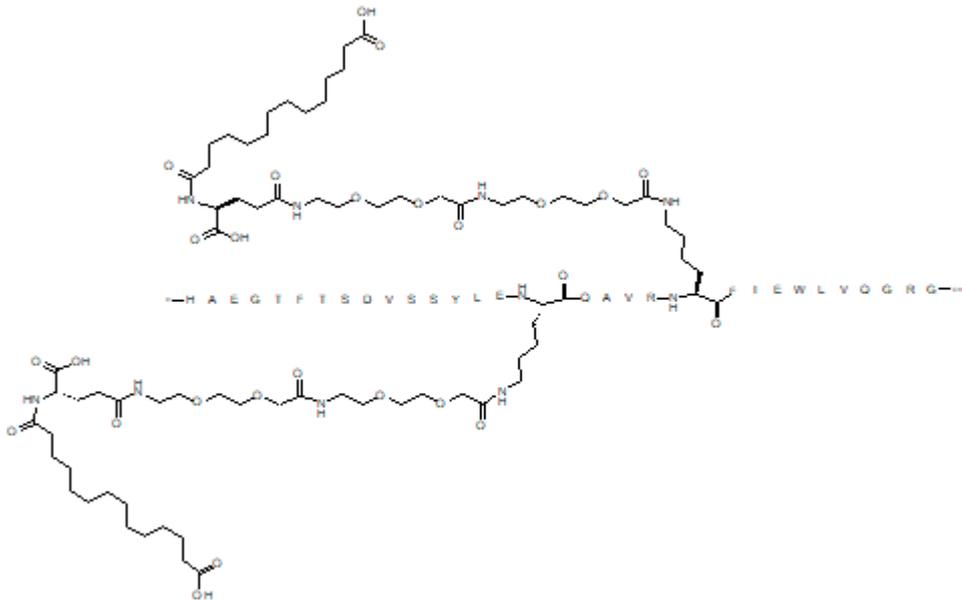
20

25

30

35

40



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 08_B2_1): Rt = 13,5 min

45

LCMS4: Rt = 2,2 min, m/z = 1621 (m/3), 1216 (m/4), 973 (m/5)

Ejemplo 12

50

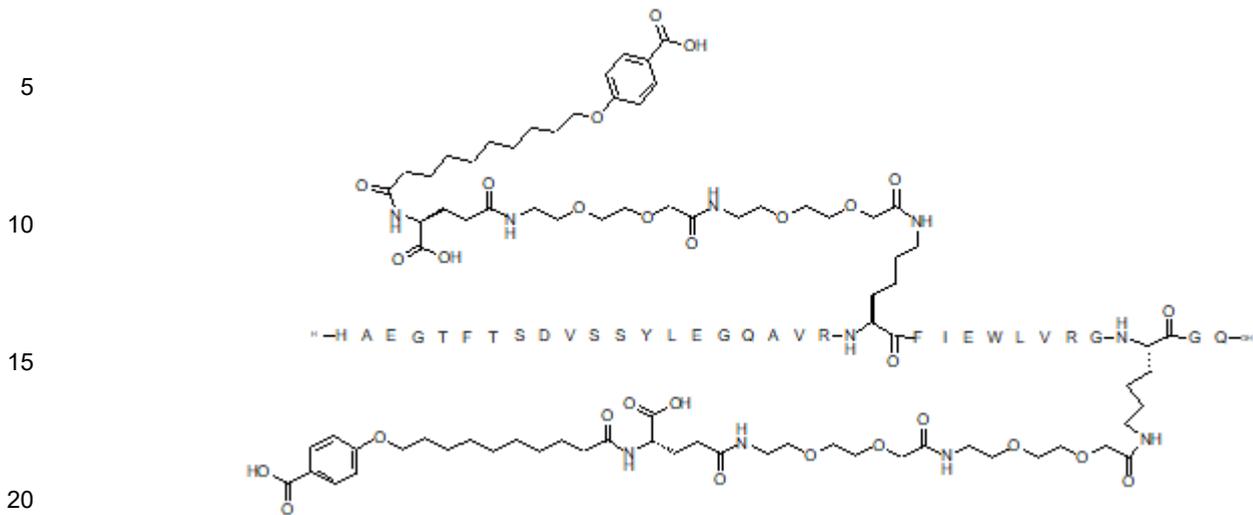
$N\alpha(N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Arg³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-peptidil]-Gln

55

60

65

Químico 61:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 8,9 min

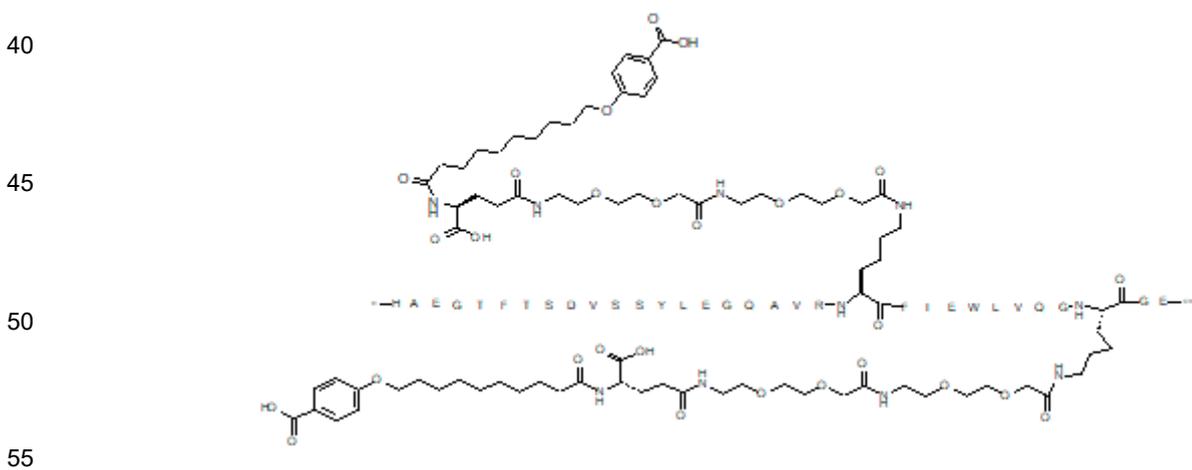
UPLC (Método 05_B7_1): Rt = 8,8 min

LCMS4: Rt = 2,2 min, m/z = 1673 (m/3), 1255 (m/4), 1004 (m/5)

Ejemplo 13

$\text{N}^{\epsilon 27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $\text{N}^{\epsilon 36}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Gln³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu

Químico 62:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 05_B9_1): Rt = 7,9 min

UPLC (Método 05_B7_1): Rt = 8,8 min

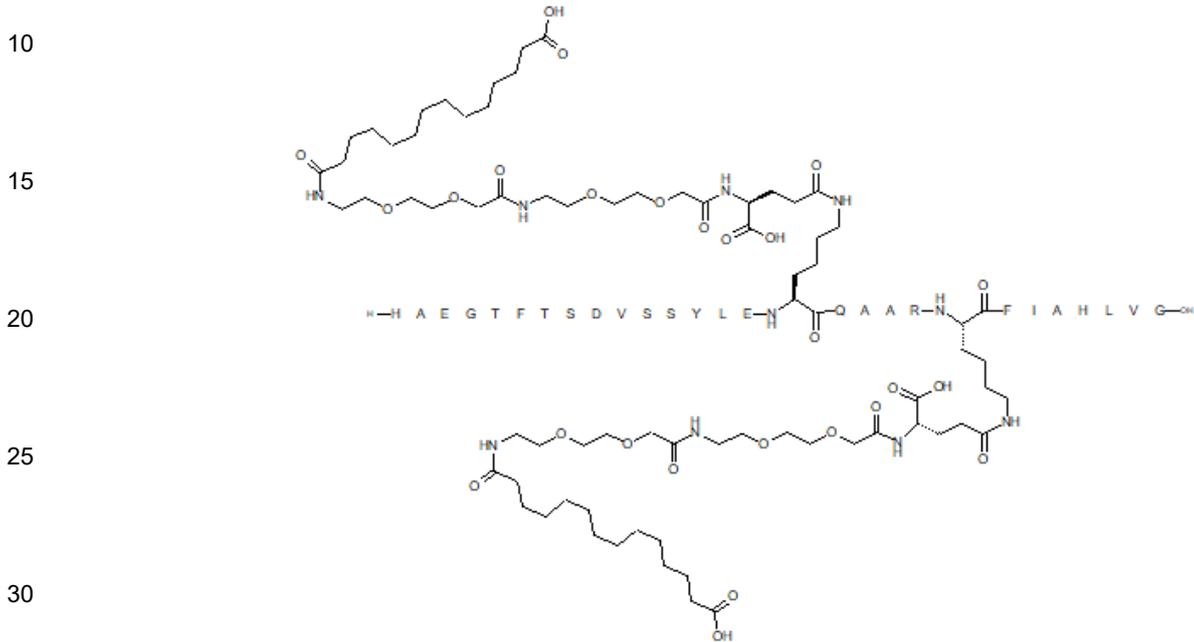
LCMS4: Rt = 2,3 min, m/z = 1663 (m/3), 1248 (m/4), 999 (m/5)

Ejemplo 14

N_{ϵ}^{22} -[[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil], N_{ϵ}^{27} -[[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Lys²²,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

5

Químico 63:



Método de preparación: Método SPPS B

35

UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,5 min

UPLC (Método 05_B7_1): Rt = 8,8 min

40

LCMS4: Rt = 2,1 min, m/z = 1462 (m/3), 1097 (m/4), 878 (m/5)

Ejemplo 15

N_{ϵ}^{27} -[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{37} -[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido

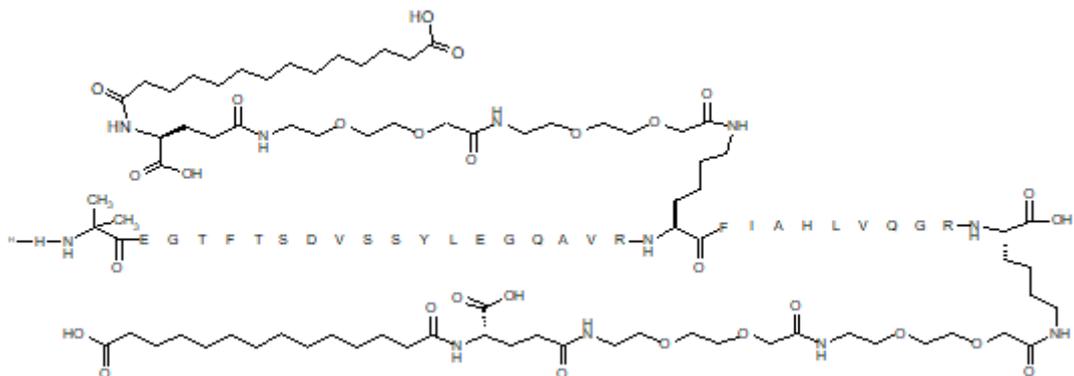
50

Químico 64:

55

60

65



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,3 min

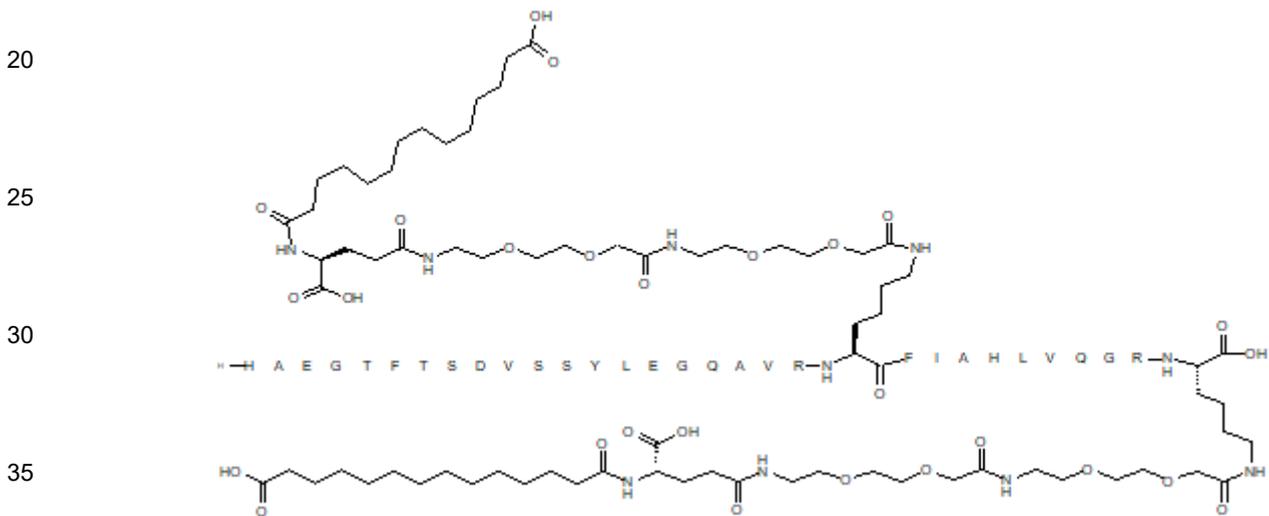
5 UPLC (Método 05_B9_1): Rt = 7,1 min

LCMS4: Rt = 2,1 min, m/z = 1589 (m/3), 1192 (m/4), 954 (m/5)

Ejemplo 16

10 N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{37} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido

15 Químico 65:



Método de preparación: Método SPPS B

40 UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,1 min

LCMS4: Rt = 2,1 min, m/z = 1585 (m/3), 1189 (m/4), 951 (m/5)

Ejemplo 17

45 N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{37} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Glu²³,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido

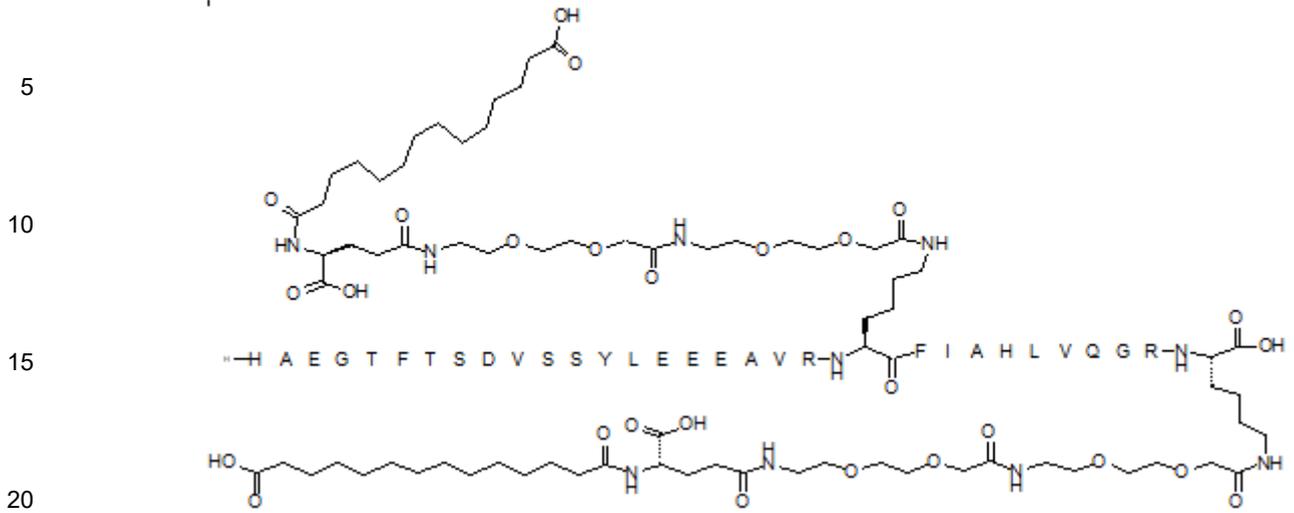
50

55

60

65

Químico 66:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,0 min

25

UPLC (Método 05_B9_1): Rt = 6,6 min

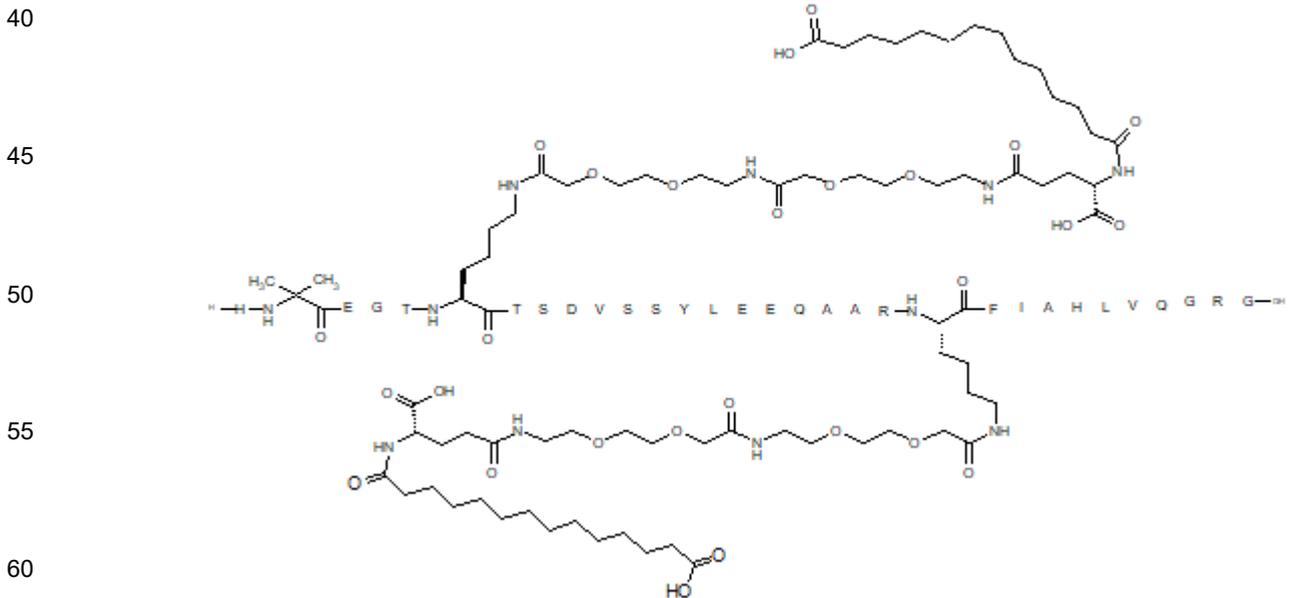
LCMS4: Rt = 2,1 min, m/z = 1609 (m/3), 1206 (m/4), 966 (m/5)

30 Ejemplo 18

Ne^{12} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], Ne^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys¹²,Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

35

Químico 67:



Método de preparación: Método SPPS B

65

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 7,66 min

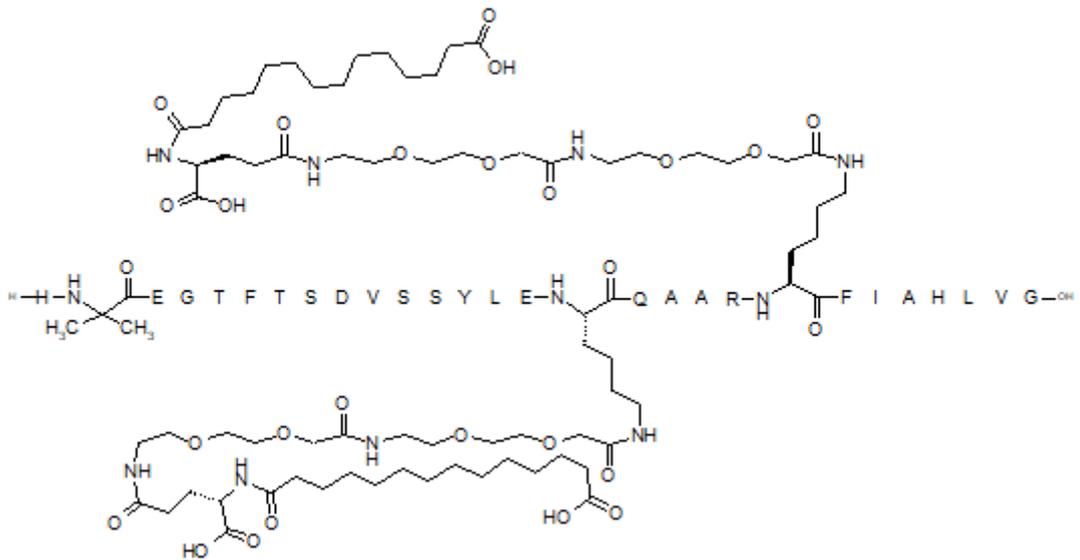
UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 4,09 min

LCMS4: Rt=1,83 min, m/z = 1181(m/4), 945 (m/5)

5 Ejemplo 19

Ne²²-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], Ne²⁷-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Lys²²,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

Químico 68:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 8,37 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 4,41 min

LCMS4: Rt = 2,00 min, m/z = 1466 (m/3), 1100 (m/4)

Ejemplo 20

Ne²²-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil], Ne²⁷-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Lys²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Glu³⁰,Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 8,4 min

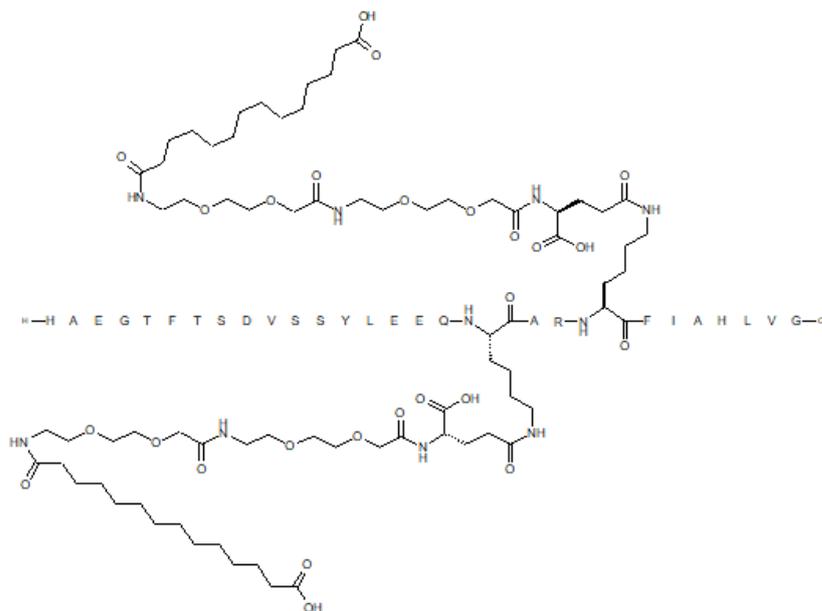
UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 9,3 min

LCMS4: Rt = 2,2 min, m/z = 1681 (m/3), 1261 (m/4), 1009 (m/5)

Ejemplo 22

N_{ϵ}^{24} -[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil], N_{ϵ}^{27} -[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Glu²²,Lys²⁴,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

Químico 71:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 8,17 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 4,65 min

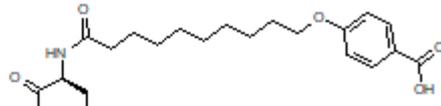
LCMS4: Rt = 1,98 min, m/z = 1481 (m/3), 1111 (m/4)

Ejemplo 23

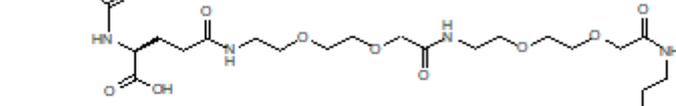
N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{36} -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Gln³⁴,Lys³⁶]-GLP-1-(7-37)-péptido

Químico 72:

5



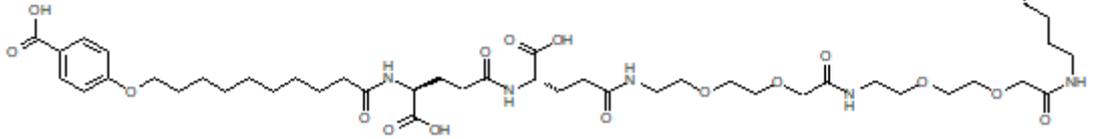
10



15



20



Método de preparación: Método SPPS B

25

UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,82 min

UPLC (Método 05_B5_1): Rt = 6,10 min

LCMS4: Rt = 2,37 min, m/z = 1687 (m/3), 1266 (m/4), 1013 (m/5)

30

Ejemplo 24

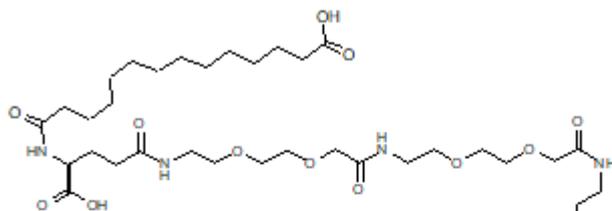
35

N^ε²⁴-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N^ε²⁷-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Lys²⁴,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

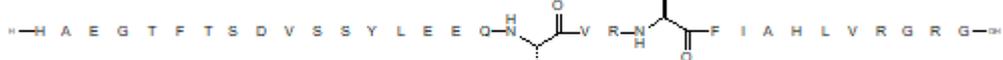
40

Químico 73:

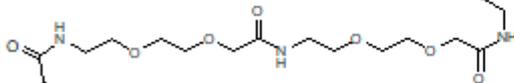
45



50



55



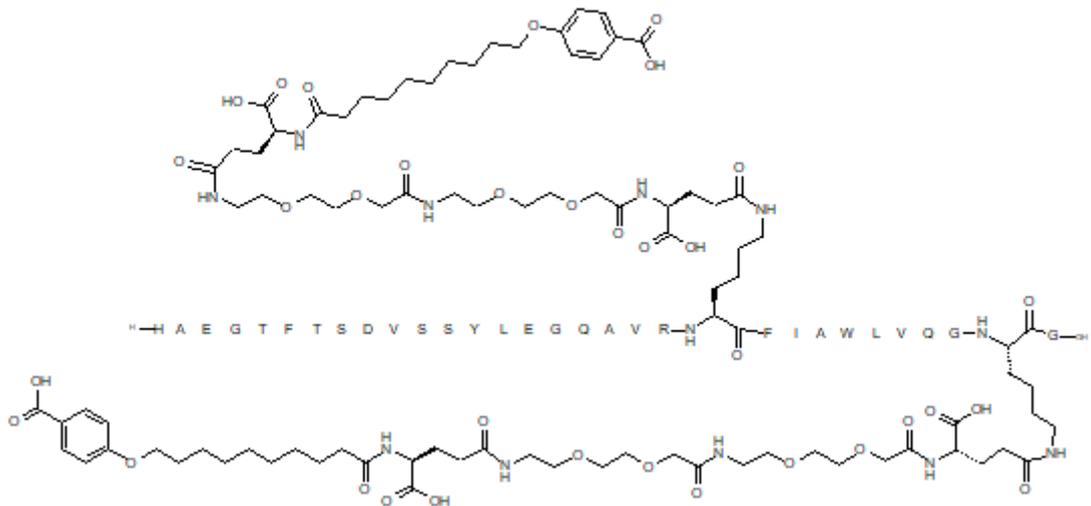
60



65

Método de preparación: Método SPPS B

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 8,96 min

UPLC (Método 05_B5_1): Rt = 6,54 min

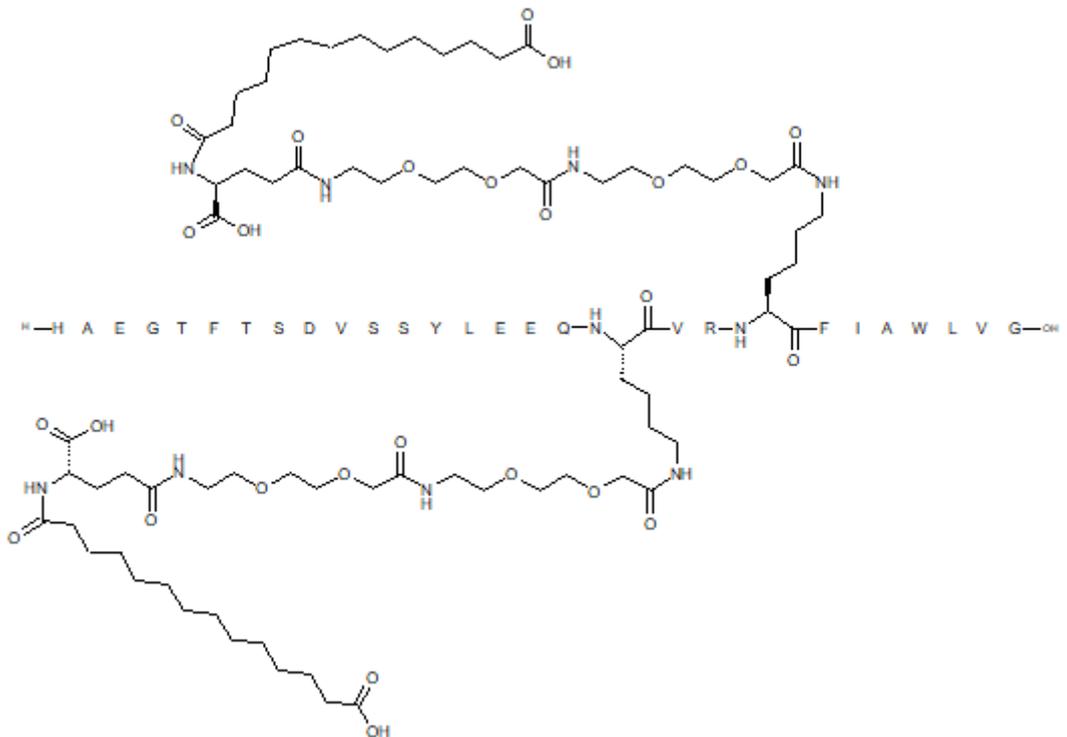
UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 5,69 min

LCMS4: m/z: Rt = 3,07 min, m/z = 1687 (m/3), 1266 (m/4), 1013 (m/5)

Ejemplo 27

N_{ϵ}^{24} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Lys²⁴,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

Químico 76:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 9,25 min

5

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 6,01 min

LCMS4: Rt = 3,31 min, m/z = 1506 (m/3), 1130 (m/4), 4520 (m/5)

10 Ejemplo 28

$N\epsilon^{24}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Lys²⁴,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

15

Químico 77:

20

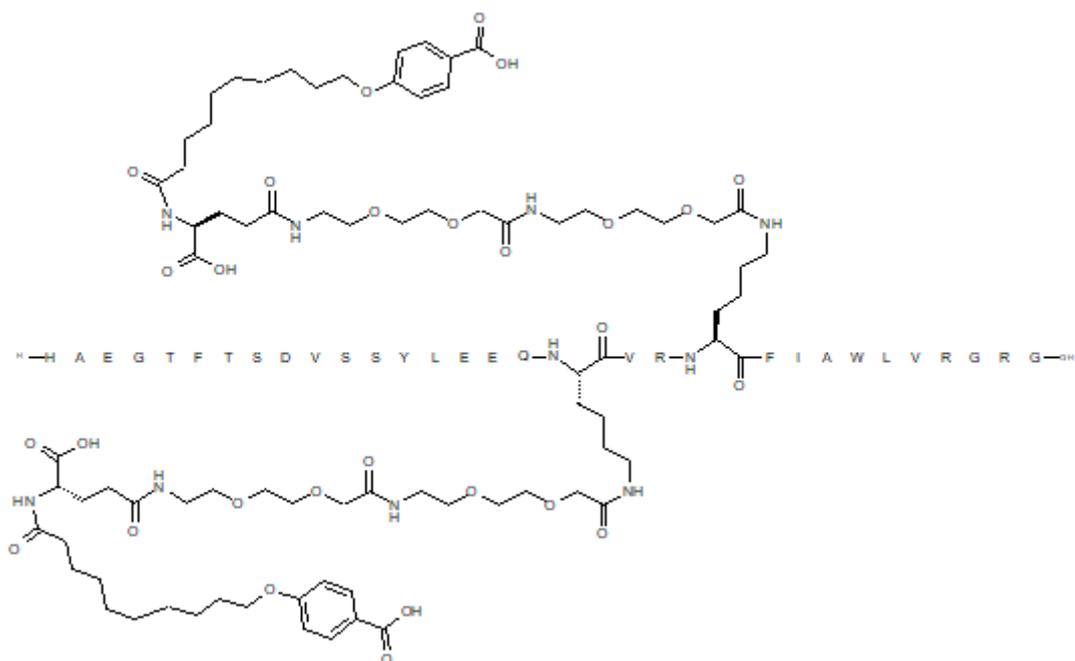
25

30

35

40

45



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 8,19 min

50

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 5,24 min

LCMS4: Rt = 3,22 min, m/z = 1663 (m/3), 1247 (m/4), 998 (m/5), 832 (m/6)

Ejemplo 29

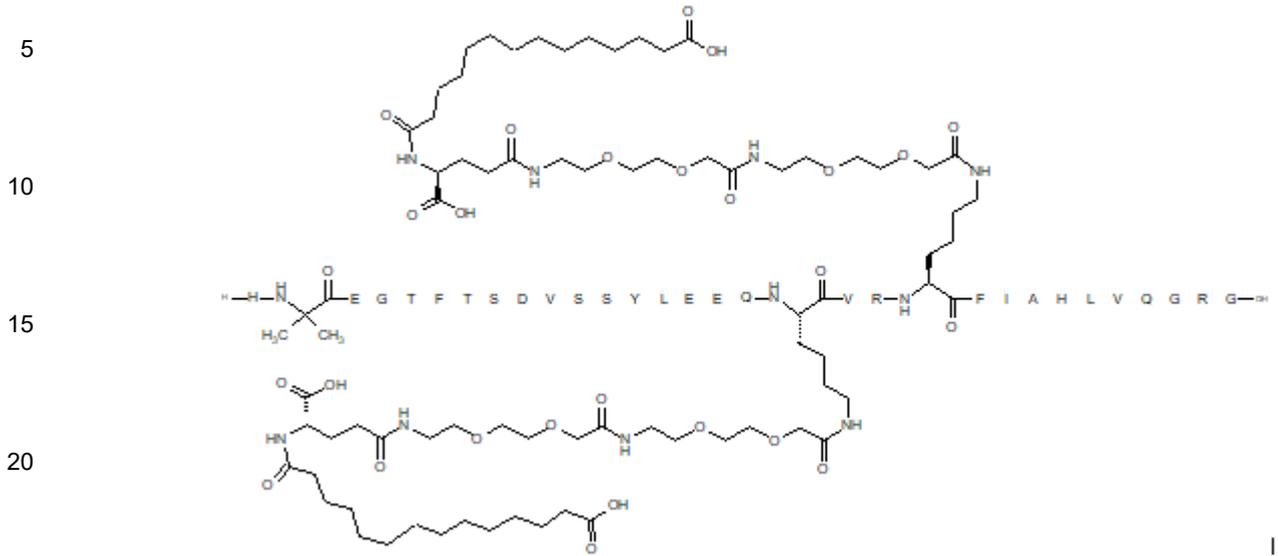
55

$N\epsilon^{24}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Glu²²,Lys²⁴,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴]-GLP-1-(7-37)-péptido

60

65

Químico 78:



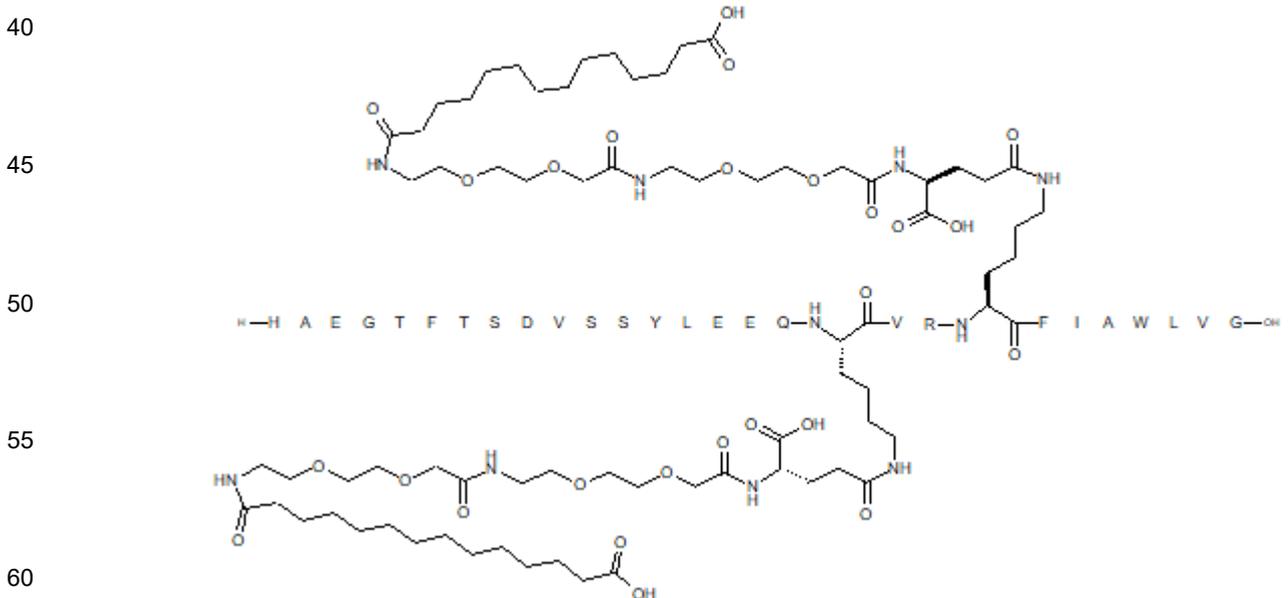
Método de preparación: Método SPPS B
 UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 7,79 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 4,87 min

30 Ejemplo 30

N_{ϵ}^{24} -[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil], N_{ϵ}^{27} -[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Glu²²,Lys²⁴,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Gly³⁴]-GLP-1-(7-34)-péptido

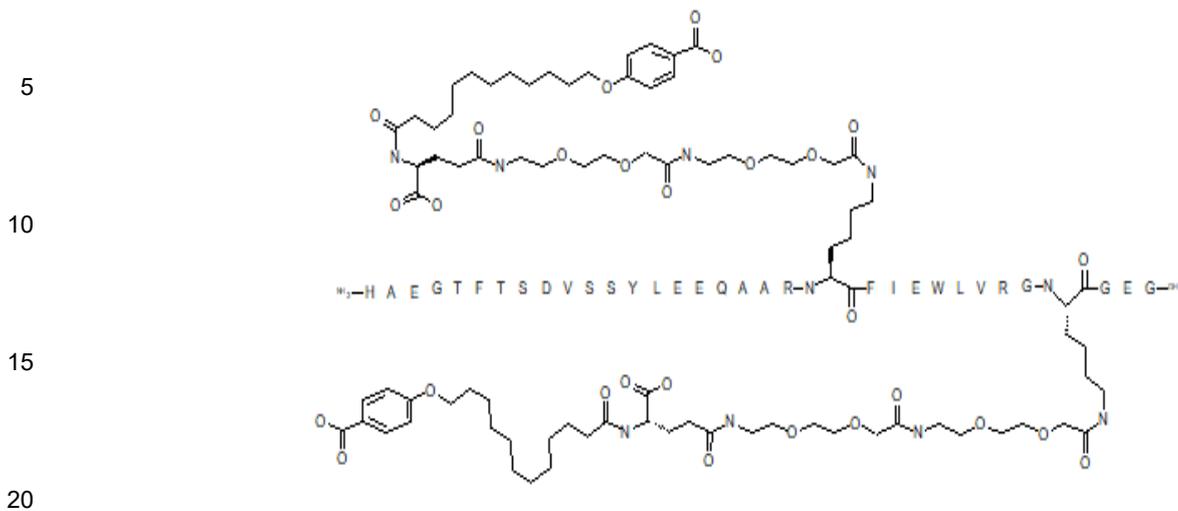
Químico 79:



Método de preparación: Método SPPS B

65 UPLC (Método 08_B4_1): Rt = 9,33 min

Químico 81:



Método de preparación: Método SPPS B

UPLC (Método 09_B4_1): Rt = 9,19 min

UPLC (Método 10_B29_1): Rt = 13,73 min

UPLC (Método 04_A6_1): Rt = 5,40 min

LCMS4: Rt = 2,44 min; m/3: 1726; m/4: 1294; m/5:1036

Métodos farmacológicos

Ejemplo 33: Potencia in vitro

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

Se determinaron las potencias de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-32 como se describe a continuación, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contiene membranas que expresan el receptor de GLP-1 humano.

Principio

Las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable, BHK467-12A (tk-ts13), que expresan el receptor de GLP-1 humano se estimularon con el análogo o derivado de GLP-1 en cuestión y la potencia de la producción de cAMP se midió mediante el uso del kit de ensayo de cAMP AlphaScreen™ de Perkin Elmer Life Sciences. El principio básico de en Ensayo AlphaScreen es una competencia entre el cAMP endógeno y el cAMP-biotina añadido exógenamente. La captura de cAMP se alcanza mediante el uso de un anticuerpo específico conjugado a perlas receptoras.

Cultivo celular y preparación de membranas

Una línea celular transfectada estable y un clon de alta expresión se seleccionaron para tamizaje. Las células se cultivaron a CO₂ al 5 % en DMEM, FCS 5 %, Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 0,5 mg/ml del marcador de selección G418.

Las células a una confluencia aproximada del 80 % se lavaron 2 veces con PBS y se cosecharon con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Todas las etapas adicionales se llevaron a cabo en hielo. El sedimento celular se homogeneizó mediante Ultrathurax durante 20-30 segundos en 10 ml de Tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH = 7,4), se centrifugó 15 minutos a 20 000 rpm y el sedimento se resuspendió en 10 ml de Tampón 2 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 7,4). La suspensión se homogeneizó durante 20-30 segundos y se centrifugó durante 15 minutos a 20 000 rpm. La suspensión en Tampón 2, homogeneización y centrifugación se repitieron una vez y las membranas se resuspendieron en Tampón 2. Se determinó la concentración de proteínas y las membranas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

ES 2 712 945 T3

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (núm. de catálogo de Costar: 3693). El volumen final por pocillo fue de 50 μ l.

Soluciones y reactivos

- 5 Kit de ensayo de cAMP AlphaScreen de Perkin Elmer Life Sciences (núm. de catálogo: 6760625M); que contiene perlasceptoras de Anti-cAMP (10 U/ μ l), perlas donantes de Estreptavidina (10 U/ μ l) y cAMP biotinilado (133 U/ μ l).

10 Tampón de AlphaScreen, pH=7,4: TRIS-HCl 50 mM (Sigma, núm. de catálogo: T3253); HEPES 5 mM (Sigma, núm. de catálogo: H3375); MgCl₂ 10 mM, 6H₂O (Merck, núm. de catálogo: 5833); NaCl 150 mM (Sigma, núm. de catálogo: S9625); Tween al 0,01 % (Merck, núm. de catálogo: 822184). Lo siguiente se añadió al Tampón de AlphaScreen antes de su uso (concentraciones finales indicadas): BSA (Sigma, núm. de catálogo A7906): 0,1 %; IBMX (Sigma, núm. de catálogo I5879): 0,5 mM; ATP (Sigma, núm. de catálogo A7699): 1 mM; GTP (Sigma, núm. de catálogo G8877): 1 μ M.

15 Estándar de cAMP (factor de dilución en ensayo = 5): Solución de cAMP: 5 μ L de una solución concentrada de 5 mM + 495 μ L de Tampón de AlphaScreen.

Se prepararon series de dilución adecuadas en tampón de AlphaScreen del estándar de cAMP así como también del análogo o derivado de GLP-1 a analizar, por ejemplo, las siguientes ocho concentraciones del compuesto GLP-1: 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} y 10^{-14} M y una serie de, por ejemplo, 10^{-6} a 3×10^{-11} de cAMP.

20 Membrana/Perlasceptoras

Las membranas se prepararon a partir de células hGLP-1/ BHK 467-12A con una concentración de 6 μ g/pocillo correspondiente a 0,6 mg/ml (la cantidad de membranas utilizadas pr. pocillo puede variar)

25 No membranas": Perlasceptoras (15 μ g/ml final) en tampón de AlphaScreen

6 μ g/membranas de pocillos": membranas + Perlasceptoras (15 μ g/ml final) en tampón de AlphaScreen

30 Una alícuota (10 μ l) de "No membranas" se añadió al estándar de cAMP (por pocillo en pocillos duplicados) y a los controles positivo y negativo

Una alícuota (10 μ l) de "6 μ g/membranas de pocillos" se añadió al GLP-1 y análogos (por pocillo en pocillos duplicados o triplicados)

35 Control Pos: 10 μ l "no membranas" + 10 μ l tampón de AlphaScreen

Control Negativo: 10 μ l de "no membranas" + 10 μ l de Solución madre de cAMP (50 μ M)

40 Como las perlas son sensibles a la luz directa, cualquier manipulación se hizo en la oscuridad (lo más oscura posible) o en luz verde. Todas las diluciones se hicieron en hielo.

Procedimiento

45 1. Hacer el Tampón de AlphaScreen.

2. Disolver y diluir GLP-1/análogos/estándar de cAMP en tampón de AlphaScreen.

50 3. Hacer la solución de perlas donantes (mediante la mezcla de perlas donantes de estreptavidina (2 unidades/pocillo) y cAMP biotinilado (1,2 unidades/pocillo) e incubar 20-30 min. en la oscuridad a temperatura ambiente.

4. Añadir el cAMP/GLP-1/análogos a la placa: 10 μ l por pocillo.

55 5. Preparar la solución de membrana/Perlas Aceptoras y añadir esto a las placas: 10 μ l por pocillo.

6. Añadir las Perlas Donantes: 30 μ l por pocillo.

60 7. Envolver la placa en papel de aluminio e incubar en el agitador durante 3 horas (muy lentamente) a RT.

8. Contar en AlphaScreen – cada placa se incubó previamente en el AlphaScreen durante 3 minutos antes del recuento.

Resultados

65

Los valores de EC₅₀ [nM] se calcularon mediante el uso del programa informático Graph-Pad Prism (versión 5) y se muestran en la Tabla 1 más adelante. La potencia de todos derivados in vitro se confirmó.

5

Tabla 1: Potencia in vitro

Compuesto del ejemplo núm.	EC ₅₀ /pM
1	26
2	43
3	62
4	143
5	468
6	96
7	9
8	159
9	242
10	214
11	81
12	41
13	79
14	42
15	5
16	21
17	17
18	3025
19	52
20	67
21	52
22	1178
23	140
24	70
25	380
26	200
27	835
28	68
29	40
30	3000
31	37
32	76

La potencia promedio in vitro para los compuestos analizados (EC₅₀ promedio) fue 340 pM. La mayoría de los derivados tuvieron una buena potencia in vitro correspondiente a un valor de EC₅₀ por debajo de 1200 pM.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, páginas 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-C12-diácido) tuvo una potencia in vitro correspondiente a un valor EC₅₀ de 1200 pM.

50

Ejemplo 34: Unión al receptor de GLP-1

El propósito de este experimento es investigar la unión al receptor de GLP-1 de los derivados de GLP-1 y cómo la unión está potencialmente influenciada por la presencia de albúmina. Esto se hace en un experimento in vitro como se describe a continuación.

55

La afinidad de unión de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-32 al receptor de GLP-1 humano se midió por medio de su capacidad para desplazar ¹²⁵I-GLP-1 del receptor. Para probar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se realizó con una baja concentración de albúmina (0,001 % - correspondiente a la cantidad residual de la misma en el trazador), así como también con una alta concentración de albúmina (2,0 % añadida). Un cambio en la afinidad de unión, IC₅₀, es una indicación de que el péptido en cuestión se une a albúmina y por lo tanto una predicción de un posible perfil farmacocinético prolongado del péptido en cuestión en modelos animales.

60

Condiciones

65

Especies (in vitro): Hámster

Punto Final Biológico: Unión al Receptor

Método de Ensayo: SPA

5

Receptor: receptor de GLP-1

Línea Celular: BHK tk-ts13

10 Cultivo de células y purificación de membrana

Una línea celular transfectada estable y un clon de alta expresión se seleccionaron para tamizaje. Las células se cultivaron a CO₂ al 10 % en DMEM, FCS 5 %, Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418.

15

Las células (aprox. 80 % de confluencia) se lavaron dos veces en PBS y se cosecharon con Versene (solución acuosa de la sal de tetrasodio del ácido etilendiaminotetraacético), después de lo cual se separaron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Las células/sedimento celular debe mantenerse en hielo en la medida que sea posible en las etapas posteriores. El sedimento celular se homogenizó con Ultrathurrax durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada de Tampón 1 (en dependencia de la cantidad de células, pero por ejemplo 10 ml). El homogenado se centrifugó a 20 000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió (homogenizó) en 10 ml de Tampón 2 y se re-centrifugó. Esta etapa se repitió una vez más. El sedimento resultante se resuspendió en el Tampón 2, y se determinó la concentración de proteínas. Las membranas se almacenaron a menos 80°C.

20

25 Tampón 1: 20 mM Na-HEPES + 10 mM EDTA, pH 7,4

Tampón 2: 20 mM Na-HEPES + 0,1 mM EDTA, pH 7,4

Ensayo de unión:

30

SPA:

Los compuestos de prueba, membranas, partículas de SPA y [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)NH₂ se diluyeron en tampón de ensayo. Se añadieron 50 ul (microlitros) de HSA (experimento en "albúmina alta" que contiene HSA al 2 %) o tampón (experimento en "albúmina baja" que contiene HSA al 0,001 %) a Optiplate, y se añadieron 25 ul de los compuestos de prueba. Se añadieron 5-10 ug de proteína de membrana/muestra (50 ul) correspondientes a 0,1 - 0,2 mg de proteína/ml (para ser optimizada preferentemente para cada preparación de membrana). Las partículas de SPA (perlas SPA de aglutinina de trigo germinado, Perkin Elmer, núm. RPNQ0001) en una cantidad de 0,5 mg/pocillo (50 ul). La incubación se inició con [¹²⁵I]-GLP-1-(7-36)NH₂ (concentración final 0,06 nM correspondiente a 49,880 DPM, 25 ul). Las placas se sellaron con PlateSealer y se incubaron durante 120 minutos a 30°C mientras se agitaba. Las placas se centrifugaron (1500 rpm, 10 min) y se contaron en Topcounter.

35

40

Tampón de ensayo:

45 HEPES 50 mM

EGTA 5 mM

MgCl₂ 5 mM

50

Tween 20 al 0,005 %

pH 7,4

55 HSA fue SIGMA A1653

Cálculos

60

El valor de IC₅₀ se leyó a partir de la curva como la concentración que desplaza el 50 % de ¹²⁵I-GLP-1 del receptor y se determinó la relación de [(IC₅₀/nM) a alta HSA] / [(IC₅₀/nM) a baja HSA].

Generalmente, la unión al receptor de GLP-1 a baja concentración de albúmina debería ser tan buena como sea posible, correspondiente a un bajo valor de IC₅₀.

65

El valor de IC₅₀ a alta concentración de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Como se conoce, los derivados de GLP-1 también se unen a albúmina. Este es un efecto

generalmente deseable, el que extiende su tiempo de vida media en plasma. Por lo tanto, el valor de IC₅₀ a albúmina alta generalmente será mayor que el valor de IC₅₀ a albúmina baja, correspondiente a una unión reducida al receptor de GLP-1, provocada por la unión a albúmina que compite con la unión al receptor de GLP-1.

- 5 Una relación alta (valor de IC₅₀ (albúmina alta) / valor de IC₅₀ (albúmina baja)) puede tomarse por lo tanto como una indicación de que el derivado en cuestión se une bien a albúmina (puede tener una vida media larga) y además *per se* se une bien al receptor de GLP-1 (el valor de IC₅₀ (albúmina alta) es alto y el valor de IC₅₀ (albúmina baja) es bajo).

Resultados

10 Los siguientes resultados se obtuvieron, donde "relación" se refiere a [(IC₅₀/nM) a alta HSA] / [(IC₅₀/nM) a baja HSA]:

Tabla 2: Afinidad de unión al receptor

Compuesto del ejemplo núm.	IC ₅₀ /nM (baja HSA)	IC ₅₀ /nM (alta HSA)	Relación
1	0,19	42	219
2	0,39	320	821
3	0,29	29	101
4	0,15	33	217
5	5,68	446	79
6	0,50	123	246
7	0,12	21	174
8	1,41	80	57
9	0,38	60	157
10	6,49	452	70
11	0,23	213	926
12	0,16	72	453
13	0,25	201	804
14	1,45	443	306
15	0,19	29	155
16	0,20	25	127
17	0,45	174	387
18	373	789	2,1
19	2,38	143	60
20	0,19	333	1752
21	1,57	256	163
22	9,31	812	87
23	0,85	40	47
24	2,74	50	18
25	10,9	39	3,5
26	0,38	54	143
27	10,3	>1000	97
28	0,20	29	144
29	3,95	363	92
30	7,44	>1000	134
31	0,35	220	629
32	0,18	369	2050

55 La relación promedio fue muy buena (aproximadamente 300). La mayoría de los derivados tuvieron una relación por encima de 50.

60 Además con respecto a la IC₅₀ (albúmina baja) la IC₅₀ promedio de los compuestos analizados fue 14 nM, y en la mayoría de los derivados estuvo por debajo de 15,0 nM.

Finalmente con respecto a la IC₅₀ (albúmina alta) la mayoría de los derivados tuvo una IC₅₀ (albúmina alta) por debajo de 900 nM.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, páginas 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-C12-diácido) tuvo una relación de 51,3, una IC₅₀ (albúmina baja) de 17,7 nM, y una IC₅₀ (albúmina alta) de 908 nM.

5 Ejemplo 35: Estimado de la biodisponibilidad oral - Inyección en intestino en rata (caprato)

El propósito de este experimento es estimar la biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1.

10 Con este fin, la exposición en plasma después de la inyección directa en el lumen intestinal de los derivados de GLP-1 de los ejemplos 2-17 y 19-22 se estudia in vivo en ratas, como se describe a continuación.

Los derivados de GLP-1 se analizan a una concentración de 1000 uM en una solución de 55 mg/ml de caprato de sodio.

15 Las ratas machos Sprague Dawley con un peso corporal a la llegada de aproximadamente 240 g se obtuvieron de Taconic (Dinamarca) y se asignaron a los diferentes tratamientos mediante aleatorización simple, 4 ratas por grupo. Las ratas se someten a ayuno durante aproximadamente 18 horas antes del experimento y se toman en anestesia general (Hypnorm/Dormicum).

20 Los derivados de GLP-1 se administran en el yeyuno ya sea en la parte proximal (10 cm distal para el duodeno) o en el intestino medio (50 cm proximal para el ciego). Se insertó un catéter PE50 de 10 cm de longitud en el yeyuno, se introdujo al menos 1,5 cm en el yeyuno y se aseguró antes de la dosificación mediante una ligadura alrededor del intestino y el catéter con una sutura de 3/0 distal a la punta para evitar la fuga o el desplazamiento del catéter. El catéter se colocó sin jeringa y aguja y se administraron 2 ml de solución salina en el abdomen antes de cerrar la
25 incisión con clips para heridas.

Se inyectan 100 µl del derivado de GLP-1 respectivo en el lumen del yeyuno a través del catéter con una jeringa de 1 ml. Posteriormente, se introdujeron 200 µl de aire en el lumen del yeyuno con otra jeringa para "enjuagar" el catéter. Esta jeringa se dejó conectada al catéter para evitar el flujo de regreso en el catéter.

30 Las muestras de sangre (200 µl) se recolectan a intervalos deseados (generalmente en los tiempos 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min) en tubos de EDTA de la vena caudal y se centrifugan 5 minutos, 10 000 G, a 4°C a los 20 minutos. Se separó el plasma (75 µl) en tubos Micronic, se congeló inmediatamente y se mantuvo a -20 °C hasta que se analizó la concentración plasmática del derivado de GLP-1 respectivo con LOCI (inmunoensayo Luminiscente de Canalización de Oxígeno), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, páginas 240-247. Las perlas donantes se recubrieron con estreptavidina, mientras que las perlas aceptoras se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo medio/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el N-terminal, se biotiniló. Los tres reactivos se combinaron con el analito y formaron un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberó átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes, que se canalizaron en las esferas aceptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz fue proporcional a la
40 concentración del compuesto.

45 Después de tomar la muestra de sangre las ratas se sacrifican bajo anestesia y se abre el abdomen para verificar la colocación correcta del catéter.

Las concentraciones plasmáticas medias (n=4) (pmol/l) se determinaron como una función del tiempo. La relación de la concentración plasmática (pmol/l) dividida por la concentración de la solución de dosificación (µmol/l) se calcula para cada tratamiento y los resultados para t = 30 min (30 minutos después de la inyección del compuesto en el yeyuno) se evalúan (exposición corregida para dosis a los 30 min) como una medida sustitutiva de la biodisponibilidad intestinal. La exposición corregida por la dosis se ha demostrado que se correlaciona significativamente con la biodisponibilidad real.

50 Se obtuvieron los siguientes resultados, donde la exposición corregida por la dosis a los 30 minutos se refiere a (la concentración plasmática 30 minutos después de la inyección del compuesto en el yeyuno (pM)), dividida por (la concentración del compuesto en la solución de dosificación (µM)):

60

65

Tabla 3: Exposición corregida por la dosis a los 30 min

	Compuesto del ejemplo núm.	Exposición corregida por la dosis a los 30 min
5	2	98
	3	67
	4	39
	5	124
10	6	93
	7	99
	8	86
	9	65
	10	187
15	11	66
	12	68
	13	126
	14	121
	15	98
20	16	115
	17	168
	19	61
	20	123
	21	140
25	22	275

Todos los derivados tuvieron una exposición corregida por la dosis a los 30 min por encima de 38.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, páginas 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-C12-diácido) tuvo una exposición corregida por la dosis a los 30 min de 38.

Ejemplo 36: Efecto sobre la glucosa en sangre y el peso corporal

El propósito del estudio es verificar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la glucosa en sangre (BG) y el peso corporal (BW) en un ambiente diabético.

Los derivados de GLP-1 se analizan en un estudio de respuesta a dosis en un modelo de ratón obeso, diabético (ratones db/db) como se describe a continuación.

Cincuenta ratones db/db (Taconic, Dinamarca), alimentados desde el nacimiento con la dieta NIH31 (NIH 31M Rodent Diet, comercialmente disponible de Taconic Farms, Inc., Estados Unidos, Consulte www.taconic.com), se inscriben para el estudio en el edad de 7-9 semanas. Los ratones tuvieron libre acceso a un pienso estándar (por ejemplo Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Dinamarca) y agua corriente y se mantuvieron a 24 °C. Después de 1-2 semanas de adaptación, la glucosa en sangre basal se evalúa dos veces en dos días consecutivos (es decir a las 9 am). Los ratones con los valores más bajos de glucosa en sangre se excluyen de los experimentos. En base a la media de los valores de glucosa en sangre, se seleccionan ratones para experimentación adicional y se asignan a 7 grupos (n=6) con niveles de glucosa concordantes. Los ratones se usan en experimentos con una duración de 48 horas, y hasta 4 veces. Después del último experimento, los ratones se sacrifican.

Los siete grupos reciben tratamiento de la siguiente manera:

1: Vehículo, s.c.

2: Derivado de GLP-1, 0,3 nmol/kg, s.c.

3: Derivado de GLP-1, 1,0 nmol/kg, s.c.

4: Derivado de GLP-1, 3,0 nmol/kg, s.c.

5: Derivado de GLP-1, 10 nmol/kg, s.c.

6: Derivado de GLP-1, 30 nmol/kg, s.c.

ES 2 712 945 T3

7: Derivado de GLP-1, 100 nmol/kg, s.c.

Vehículo: fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4.

5 El derivado de GLP-1 se disuelve en el vehículo, a concentraciones de 0,05, 0,17, 0,5, 1,7, 5,0 y 17,0 nmol/ml. Los animales se dosifican s.c. con un volumen de dosis de 6 ml/kg (es decir, 300 μ l por 50 g de ratón).

10 El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evalúa en el tiempo de -1/2h (8.30 a.m.), donde después los ratones se pesan. El derivado de GLP-1 se dosifica a aproximadamente las 9 am (tiempo 0). El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evalúa en los tiempos 1, 2, 4 y 8 h (10 am, 11 am, 1 pm y 5 pm). Los ratones se pesan después del muestreo en sangre a las 8 h.

15 En los días siguientes, se evalúa la glucosa en sangre a los tiempos 24 y 48 después de la dosificación (es decir, a las 9 a.m. del día 2 y 3). En cada día, los ratones se pesan después del muestreo de glucosa en sangre.

Los ratones se pesan individualmente en una pesa digital.

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

25 ED₅₀ es la dosis que da lugar a efecto semimáximo en nmol /kg. Este valor se calcula sobre la base de la capacidad de los derivados a menor peso corporal así como también la capacidad a menor glucosa en sangre, como se explicó anteriormente.

30 ED₅₀ para peso corporal se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre delta BW 8 horas después de la administración subcutánea del derivado. Por ejemplo, si la disminución máxima del peso corporal después de 8 horas es 2,0 g, entonces la ED₅₀ del peso corporal podría ser la dosis en nmol/kg que da lugar a una disminución del peso corporal después de 8 horas de 1,0 g. Esta dosis (ED₅₀ peso corporal) puede leerse a partir de la curva de respuesta a dosis.

35 ED₅₀ para la glucosa en sangre se calcula como la dosis que da lugar a un efecto semimáximo sobre delta BG en AUC 8 horas y/o 24 horas después de la administración subcutánea del análogo.

40 El valor de ED₅₀ sólo puede calcularse si existe una relación sigmoideal de respuesta a dosis apropiada con una clara definición de la respuesta máxima. Por lo tanto, si este no fuera el caso el derivado en cuestión puede volverse a analizar en un intervalo de dosis diferente para observar si se obtiene una relación sigmoideal de respuesta-dosis.

Ejemplo 37: Vida media en minicerdos

45 El propósito de este estudio fue determinar la prolongación in vivo de los derivados de GLP-1 después de la administración i.v. a minicerdos, es decir la prolongación de su tiempo de acción. Esto se hizo en un estudio farmacocinético (PK), donde se determinó la vida media terminal del derivado en cuestión. Por vida media terminal generalmente se entiende el período de tiempo que se tarda en reducir a la mitad una determinada concentración plasmática, medida después de la fase de distribución inicial.

50 En los estudios se usaron minicerdos de Göttingen machos obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmoose, Dinamarca), de aproximadamente 7-14 meses de edad y con un peso aproximado de 16-35 kg. Los minicerdos se alojaron individualmente y se alimentaron de forma restringida una o dos veces al día con dieta SDS para minicerdos (Special Diets Services, Essex, Reino Unido). Después de al menos 2 semanas de aclimatación, se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis o cranial en cada animal. A los animales se les permitió una recuperación de 1 semana después de la cirugía y después se usaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de reposo adecuado entre las dosificaciones sucesivas de los derivados de GLP-1.

55 Los animales se mantuvieron en ayunas durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y de 0 a 4 h después de la dosificación, pero tuvieron acceso ad libitum al agua durante todo el período.

60 Los derivados de GLP-1 se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración generalmente de 20-60 nmol/ml. Se administraron inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a generalmente 1-2 nmol/kg, por ejemplo 0,033 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter, y se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos hasta 13 días después de la dosificación (preferentemente a través del otro catéter). Las muestras de sangre (por ejemplo 0,8 ml) se recolectaron en tampón de EDTA (8 mM) y después se centrifugaron a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos. El plasma se pipeteó en tubos

Micronic sobre hielo seco y se mantuvo a -20 °C hasta que se analizó la concentración plasmática del compuesto de GLP-1 respectivo mediante el uso de ELISA o un ensayo basado en anticuerpo similar o LC-MS. Los perfiles individuales de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante un modelo no compartimental en Phoenix WinNonlin ver. 6,2. (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos), y se determinaron los tiempos de vida media terminales resultantes (media armónica).

Resultados

El derivado del ejemplo 2 se analizó y tuvo un tiempo de vida media de 87 horas.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, páginas 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K^{26,34} con bis-C12-diácido) tuvo un tiempo de vida media de 5 horas.

Ejemplo 38: Efecto sobre la ingesta de alimentos

El propósito de este experimento es investigar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la ingesta de alimentos en cerdos. Esto se realizó en un estudio farmacodinámico (PD) como se describe a continuación, en el cual la ingesta de alimentos se midió de 1 a 4 días después de la administración de una dosis única del derivado de GLP-1, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo.

Se usaron cerdos hembras Landrace Yorkshire Duroc (LYD), de aproximadamente 3 meses de edad, con peso de aproximadamente 30-35 kg (n=3-4 por grupo). Los animales se alojaron en un grupo durante aproximadamente 1 semana para su adaptación a las instalaciones de los animales. Durante el periodo experimental los animales se colocaron en corrales individuales al menos 2 días antes de la dosificación y durante todo el experimento para la medición individual de la ingesta de alimentos. Los animales se alimentaron ad libitum con forraje de cerdo (Svinefoder Danish Top) en todos los momentos durante la aclimatación y el periodo experimental. La ingesta de alimentos se controló en línea registrando el peso del forraje cada 15 minutos. El sistema usado fue Mpigwin (Ellegaard Systems, Faaborg, Dinamarca).

Los derivados de GLP-1 se disuelven en un tampón fosfato (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4) a concentraciones de 12, 40, 120, 400 o 1200 nmol/ml que corresponden a dosis de 0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg. El tampón fosfato sirve como vehículo. Los animales se dosificaron con una sola dosis subcutánea del derivado de GLP-1 o vehículo (volumen de dosis de 0,025 ml/kg) en la mañana del día 1 y la ingesta de alimentos se midió durante 1-4 días después de la dosificación. El último día de cada estudio, 1-4 días después de la dosificación, se tomó una muestra de sangre para medir la exposición en plasma del derivado de GLP-1 del corazón en animales anestesiados. A continuación, los animales se sacrificaron con una sobredosis intracardíaca de pentobarbital. El contenido en plasma de los derivados de GLP-1 se analizó mediante el uso de ELISA o un ensayo basado en anticuerpos similar, o LC-MS.

La ingesta de alimentos se calcula como la media \pm SEM de la ingesta de alimentos en 24 h en cada uno de los días experimentales. Las comparaciones estadísticas de la ingesta de alimentos en 24 horas en el grupo vehículo frente al derivado de GLP-1 se realizan mediante el uso de ANOVA de mediciones repetidas de dos vías, seguido por la prueba posterior de Bonferroni.

El compuesto del ejemplo 10 se analizó en una dosis de 3 nmol/kg, y a esta dosis no se observó efecto sobre la ingesta de alimentos. El compuesto del ejemplo 2 se analizó en una dosis de 3 nmol/kg y mostró una reducción significativa de la ingesta de alimentos en ambos días del experimento (23 % en el día 1, y 35 % en el día 2).

Ejemplo 39: Farmacocinética en rata

El propósito de este Ejemplo es investigar la vida media in vivo en rata.

Los estudios farmacocinéticos in vivo en ratas se realizaron con los derivados de GLP-1 de los ejemplos 2, 10, 17-18 y 31, como se describe a continuación. Se incluyó la semaglutida para la comparación.

Las ratas Sprague Dawley machos de la misma edad con un peso corporal de aproximadamente 400 g se obtuvieron de Taconic (Dinamarca) y se asignaron a los tratamientos mediante aleatorización simple del peso corporal, aproximadamente 4 ratas por grupo, de manera que todos los animales en cada grupo fueran de peso corporal similar.

Los derivados de GLP-1 (aproximadamente 6 nmol/ml) se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4. Se administraron inyecciones intravenosas (1,0 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter implantado en la vena yugular derecha. Se tomaron muestras de sangre de la vena sublingual durante 5 días después de la dosificación. Las muestras de sangre (200 μ l) se recolectaron en tampón de EDTA (8 mM) y después se centrifugaron a 4 °C y 10 000 G durante 5 minutos. Las muestras de plasma se mantuvieron a -20 °C hasta que se analizaron las concentraciones plasmáticas del compuesto de GLP-1 respectivo.

Las concentraciones plasmáticas de los compuestos de GLP-1 se determinaron mediante el uso de un Inmunoensayo de Canalización de Oxígeno de Luminiscencia (LOCI), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, páginas 240-247. Las perlas donantes se recubrieron con estreptavidina, mientras que las perlasceptoras se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo medio/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el N-terminal, se biotiniló. Los tres reactivos se combinaron con el analito y formaron un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberó átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes, que se canalizaron en las esferasceptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz fue proporcional a la concentración del compuesto.

Los perfiles de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante el uso de Phoenix WinNonLin ver. 6.2, Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos) y el tiempo de vida media ($T_{1/2}$) se calculó mediante el uso de los perfiles individuales de concentración plasmática en el tiempo de cada animal.

Resultados

El tiempo de vida media de la semaglutida analizada en las mismas condiciones (pero con n=8) fue de 11 horas.

Tabla 4: Tiempo de vida media en rata

Compuesto del ejemplo núm.	$t_{1/2}$ / h
2	26
10	23
17	10
18	10
31	19

Los derivados de la invención analizados tuvieron un tiempo de vida media que fue similar o mejor al de semaglutida.

Ejemplo 40: Estimado de biodisponibilidad oral - Inyección en intestino y alimentación por sonda gástrica en rata (SNAC)

El propósito de este experimento es estimar la biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 en un modelo de rata. En breve, una solución líquida del derivado de GLP-1 en sodio N- β -(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato (SNAC) se administra por inyección en intestino (a los intestinos), o por alimentación por sonda gástrica (al estómago) y se mide la exposición posterior en plasma del derivado de GLP-1.

Una solución concentrada de 250 mg/ml de SNAC se preparó mediante la disolución de SNAC (12,5 g) en agua de laboratorio altamente pura (MilliQ) (50,0 ml). El pH se ajustó a aproximadamente 8,5 con NaOH (ac) 1 N.

Las soluciones con aproximadamente 1000 μ M (800-1200 μ M) de los derivados de GLP-1 en 250 mg/ml de SNAC se prepararon mediante la disolución de la cantidad deseada del derivado de GLP-1 respectivo en la solución concentrada de SNAC. La concentración del derivado de GLP-1 se determinó antes de la administración mediante un método del estado de la materia, tal como CLND-HPLC (detección de nitrógeno quimioluminiscente para HPLC).

32 ratas Sprague Dawley machos con un peso corporal a la llegada de aproximadamente 240 g se obtienen de Taconic (Dinamarca) y se asignan a los diferentes tratamientos por aleatorización simple, 8 ratas por grupo. Todas las ratas se sometieron a ayuno en rejillas durante aproximadamente 18 horas antes del experimento.

Para inyección en intestino, en el día de experimento, las ratas se tomaron en anestesia general (Hypnorm/Dormicum) y permanecieron anestesiadas durante todo el experimento. Los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 5-7 se administraron en la parte proximal del yeyuno (10 cm distal para el duodeno). Se insertó un catéter PE50, de 10 cm de longitud, en el yeyuno, se envió al menos 1,5 cm dentro del yeyuno y se aseguró antes de la dosificación mediante una ligadura alrededor del intestino. Además, el catéter se proporcionó con una sutura 3/0 distal a la punta para evitar la fuga o el desplazamiento del catéter. El catéter se coloca sin jeringa y aguja y se administran 2 ml de solución salina en el abdomen antes de cerrar la incisión con clips para heridas.

Se inyectaron 100 μ l de solución de SNAC del derivado de GLP-1 respectivo en la luz del yeyuno a través del catéter con una jeringa de 1 ml. Posteriormente, se introducen 200 μ l de aire en la luz del yeyuno con otra jeringa para "enjuagar" el catéter. Esta jeringa se deja conectada al catéter para evitar el flujo de regreso en el catéter.

Las muestras de sangre (200 μ l) se recolectaron a intervalos deseados (generalmente a veces 0, 30, 60, 120 y 180 min) en tubos con EDTA de la vena caudal.

Para alimentación por sonda gástrica, los animales estuvieron conscientes durante todo el experimento.

Se administraron 100 µl de solución de SNAC de los derivados de GLP-1 mediante alimentación por sonda gástrica directamente al estómago.

5 Las muestras de sangre (200 µl) se recolectaron a intervalos deseados (generalmente a los 0, 30, 60, 120 y 180 minutos) en tubos con EDTA del plexo sublingual.

10 Todas las muestras de sangre obtenidas se mantuvieron en hielo y se centrifugaron durante 5 minutos, 10 000 G, a 4°C en 20 minutos. El plasma (75 µl) se separa en tubos Micronic, se congela inmediatamente y se mantiene a -20 °C hasta que se analiza la concentración plasmática del derivado de GLP-1 respectivo con LOCI (Inmunoensayo Luminiscente de Canalización de Oxígeno), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, páginas 240-247. Las perlas donantes se recubren con estreptavidina, mientras que las perlasceptoras se conjugan con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo medio/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el N-terminal, se biotinila. Los tres reactivos se combinan con el analito y forman un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo libera átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes, que se canalizan en las perlas receptoras y desencadenan la quimioluminiscencia que se mide en un lector de placas Envision. La cantidad de luz es proporcional a la concentración del compuesto.

20 Después de tomar la muestra de sangre se sacrificaron todas las ratas bajo anestesia y se abrió el abdomen de las ratas de inyección en intestino para verificar la colocación correcta del catéter.

25 Las concentraciones plasmáticas medias (n=8) (pmol/l) se determinan como una función del tiempo. El AUC de la curva de exposición en plasma (pmol/l) frente al tiempo, del tiempo 30 a 180 (min), se corrigió para dosis, es decir, se dividió por la cantidad (dosis) del derivado en la solución dosificada (pmol). Por lo tanto, el AUC corregida para dosis de la exposición en plasma del tiempo 30-180 min (que tiene la unidad de min x pM / pmol = min/L) se usó como una medida indirecta de biodisponibilidad, una medida para clasificar los derivados con respecto a su ingesta en el modelo de rata.

30 Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados de GLP-1 doblemente acilados

35 <130> 8326.204-WO

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1

<211> 31

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<220>

<221>mat_péptido

<222>(1)..(31)

50 <400> 1

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

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

65

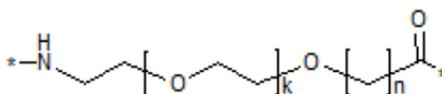
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de un análogo de GLP-1, dicho análogo comprende un primer residuo K en una posición correspondiente a la posición 27 de GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1); un segundo residuo K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37); y un máximo de diez cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37); en donde el primer residuo K se designa K²⁷, y el segundo residuo K se designa K³⁷; dicho derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a K²⁷ y K³⁷, respectivamente, por medio de un enlazador, en donde la porción de prolongación se selecciona del Químico 2 y Químico 1:



en donde x es un número entero en el intervalo de 6-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 3-17; y el enlazador comprende el Químico 5:

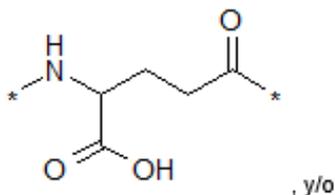
Químico 5:



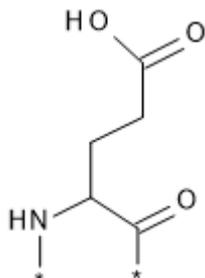
en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 1-5; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. El derivado de conformidad con la reivindicación 1, en donde el enlazador comprende además un dirradical Glu seleccionado del Químico 6 y/o el Químico 7:

Químico 6:



Químico 7:



3. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazador se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.
4. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el Químico 5 se incluye m veces, en donde m es un número entero en el intervalo de 1-10.

5. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el dirradical Glu se incluye p veces, en donde p es un número entero en el intervalo de 1-2.
6. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde x es 12.
7. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde "y" es un número entero en el intervalo de 9-11.
8. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde k es 1.
9. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde n es 1.
10. El derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo comprende un análogo de GLP-1 de Fórmula I:

Fórmula I:

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Phe-Ile-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉,

en donde

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

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

Xaa₁₂ es Lys o Phe;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Arg, Asn, Gln, o Glu;

Xaa₁₉ es Tyr o Gln;

Xaa₂₀ es Leu, Lys, o Met;

Xaa₂₂ es Gly, Glu, Lys, o Aib;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, o Arg;

Xaa₂₄ es Ala o Lys;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₆ es Val, His, o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, o Arg;

Xaa₃₁ es Trp o His;

Xaa₃₄ es Glu, Asn, Gly, Gln, o Arg;

Xaa₃₅ es Gly, Aib, o ausente;

Xaa₃₆ es Arg, Gly, Lys, o ausente;

Xaa₃₇ es Lys;

Xaa₃₈ es Ser, Gly, Ala, Glu, Gln, Pro, Arg, o está ausente; y

Xaa₃₉ es Gly o ausente.

11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de los siguientes:
 ϵ ^{N27}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], ϵ N37-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Químico 50:

5

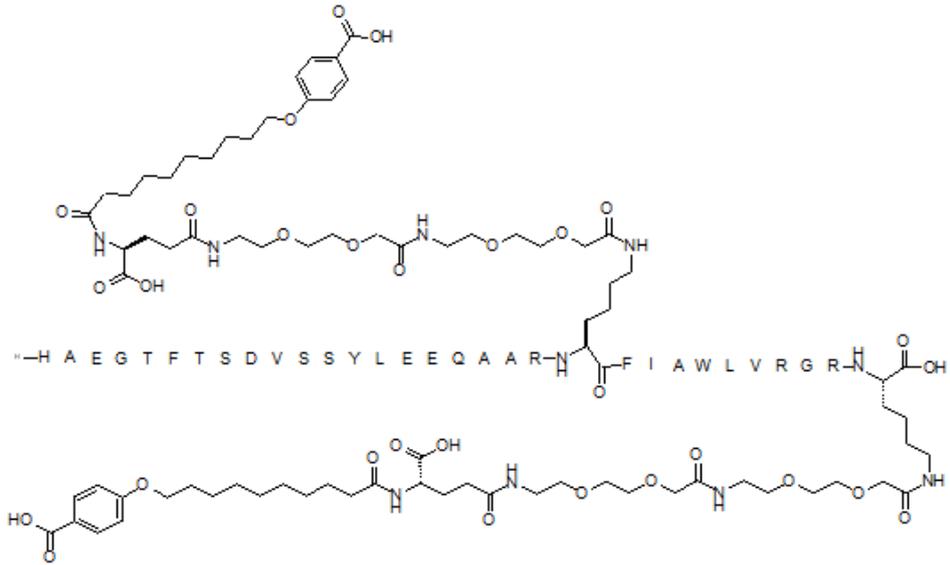
10

15

20

25

30



N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{37} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,Arg³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Químico 53:

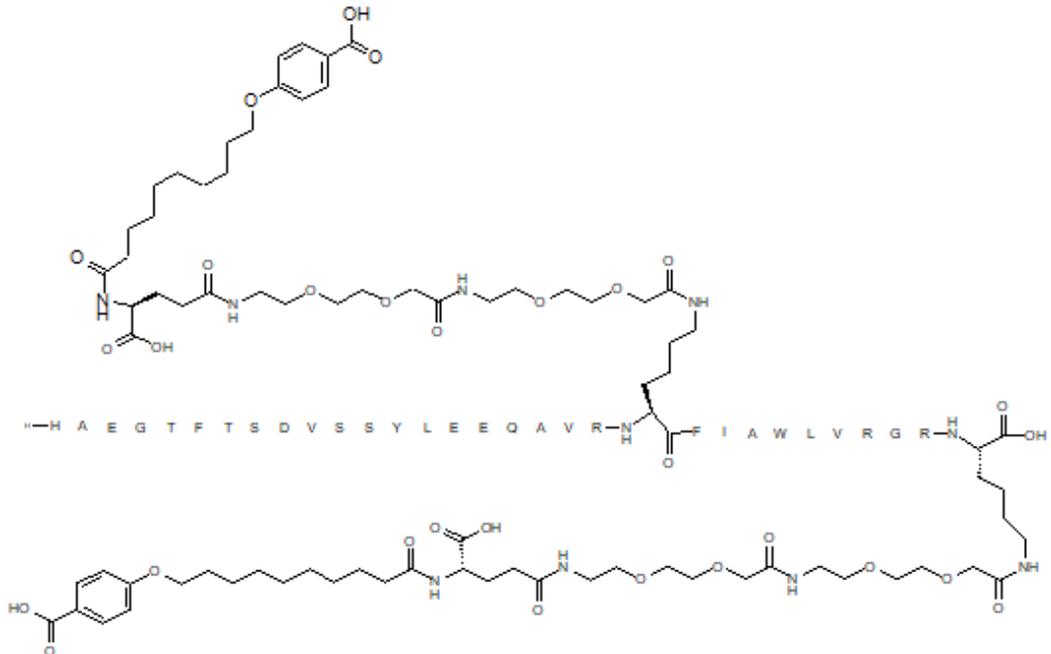
35

40

45

50

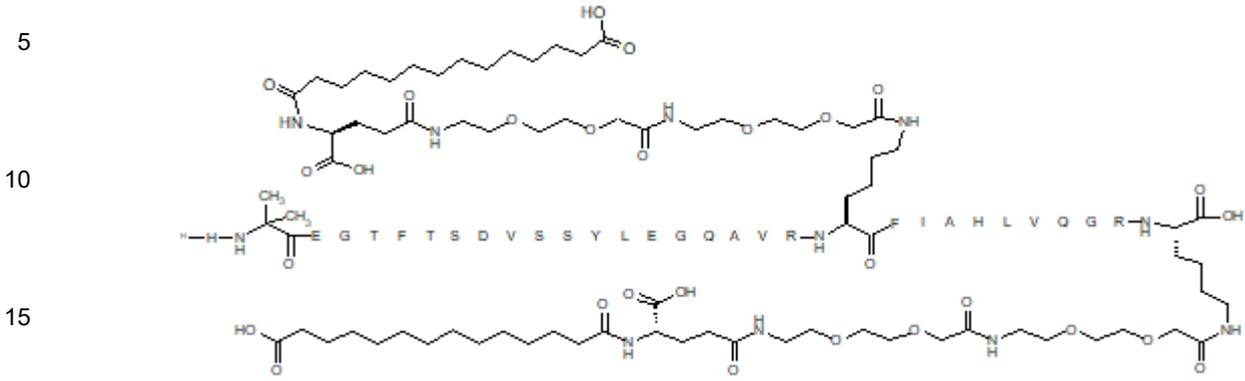
55



N_{ϵ}^{27} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N_{ϵ}^{37} -[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib⁸,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido,

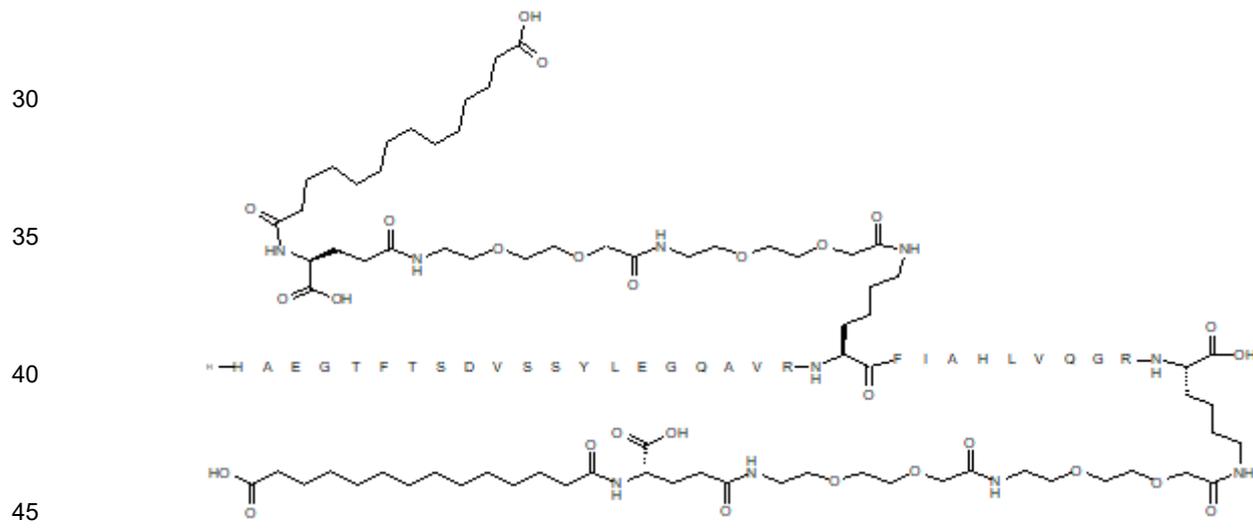
Químico 64:

65



20 $N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido,

25 Químico 65:

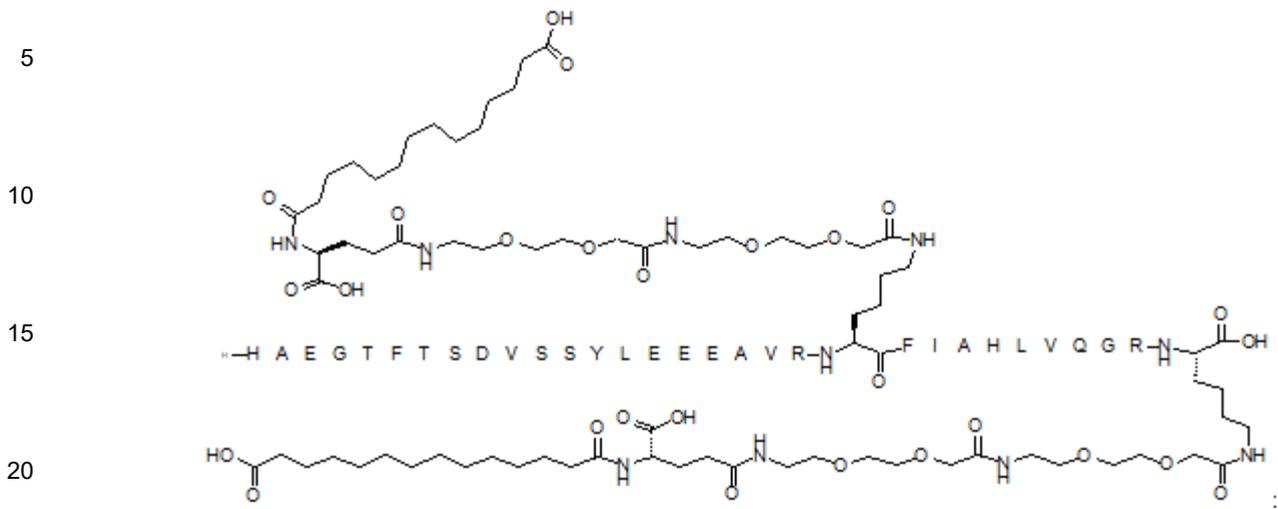


50 $N\epsilon^{27}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], $N\epsilon^{37}$ -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu²²,Glu²³,Val²⁵,Arg²⁶,Lys²⁷,His³¹,Gln³⁴,Lys³⁷]-GLP-1-(7-37)-péptido,

55 y Químico 66:

60

65



o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 25 12. Un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1):
 (i) 22E, 26R, 27K, 34R, 37K;
 (iv) 22E, 25V, 26R, 27K, 34R, 37K;
 (xv) 8Aib, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K;
 30 (xvi) 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K; y
 (xvii) 22E, 23E, 25V, 26R, 27K, 31H, 34Q, 37K;
 o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 35 13. Un derivado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para usar como un medicamento.
- 40 14. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.