

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 185**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/EP2014/064033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14734816 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3016975**

54 Título: **Derivados de péptidos similares a GLP-1, y sus usos**

30 Prioridad:

**04.07.2013 EP 13175094**  
**12.07.2013 US 201361845646 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REEDTZ-RUNGE, STEFFEN;**  
**KOFOED, JACOB;**  
**TORNOE, CHRISTIAN WENZEL y**  
**SAUERBERG, PER**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 713 185 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de péptidos similares a GLP-1, y sus usos

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de péptidos similares a GLP-1, que pueden definirse como análogos extendidos en el extremo C-terminal del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1). Los derivados son doblemente acilados, y una de las cadenas laterales acilo se une al aminoácido C-terminal del péptido similar a GLP-1. La invención se refiere, además, al uso farmacéutico de estos derivados.

Antecedentes de la invención

Los documentos WO 2009/030771 A1 y WO 2011/080102 describen varios derivados de GLP-1 monoacilados que incluyen algunos que están acilados con diácidos grasos C12-C20.

Los documentos WO 2012/140117 A1, WO 2012/062803 A1 y WO 2012/062804 A1 describen varios derivados de GLP-1 doblemente acilados que incluyen algunos que están acilados con diácidos grasos C12-C18.

## 20 Breve descripción de la invención

Liraglutida es un derivado de GLP-1 para una administración una vez al día. Se comercializa con el nombre comercial de VICTOZA® por Novo Nordisk A/S.

25 Semaglutida es un derivado de GLP-1 para una administración una vez a la semana. Está en desarrollo por Novo Nordisk A/S. Este compuesto se describe en el documento WO 2006/097537 Ejemplo 4.

La invención se refiere a derivados de péptidos similares a GLP-1 que tienen potencial para una administración una vez al mes.

30 Los derivados son doblemente acilados. Uno de los sitios de acilación es en el extremo C-terminal, más en particular en la posición que cuando se compara con GLP-1(7-37) nativo correspondería a la posición número 42. El otro sitio de acilación es internamente en el péptido similar a GLP-1, más en particular en una de las posiciones correspondientes a la posición 18, 23, 27, 31, 36, o 38 en GLP-1(7-37) nativo. Se usa un diácido graso largo para ambas acilaciones.

En un segundo aspecto la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los derivados de la invención y excipientes farmacéuticamente aceptables, así como también el uso médico de los derivados.

40 Los análogos de GLP-1 que se incorporan en los derivados de la invención comprenden los siguientes cambios de aminoácidos cuando se comparan con GLP-1 (7-37) (sec. con núm. de ident.:1): i) (8Aib, 22E, 26R, 27K, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); ii) (8Aib, 22E, 26R, 31K, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); iii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K); iv) (8Aib, 22E, 23K, 26R, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); v) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); vi) (8Aib, 18K, 22E, 26R, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); vii) (7Imp, 8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K); viii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38A, 39E, 40S, 41P, 42K); ix) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38E, 39G, 40P, 41A, 42K); x) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38P, 39A, 40S, 41E, 42K); xi) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39P, 40E, 41G, 42K) (sec. con núm. de ident.: 12); xii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39S, 40A, 41E, 42K); o xiii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39S, 40P, 41E, 42K).

50 La secuencia de aminoácidos del GLP-1 (7-37) humano nativo se incluye en el Listado de Secuencias como sec. con núm. de ident.: 1 y las secs. con núms. de ident.: 2-14 son análogos de GLP-1 específicos de los derivados de GLP-1 de la invención.

55 Los derivados de la invención representan un salto notable en la búsqueda de derivados de GLP-1 de tiempos de vida media muy largos y aún con muy buena potencia.

Descripción

60 En lo que sigue, las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo:  $\alpha$  = alfa;  $\beta$  = beta;  $\varepsilon$  = épsilon;  $\gamma$  = gamma;  $\delta$  = delta;  $\omega$  = omega; etc. Además, la letra griega de  $\mu$  puede representarse por "u", por ejemplo en  $\mu\text{l}$  = ul, o en  $\mu\text{M}$  = uM.

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

65 El péptido similar a GLP-1 comprende un péptido de fórmula I:

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Xaa12-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Xaa31-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37-Xaa38-Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42, en donde

5 Xaa7 es L-histidina, ácido (S)-2-hidroxi-3-(1H-imidazol-4-il)-propiónico, D-histidina, desamino-histidina, homohistidina, N<sup>α</sup>-acetil-histidina, N<sup>α</sup>-formil-histidina, N<sup>α</sup>-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Ser, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, o ácido (1-aminociclobutil)carboxílico; Xaa12 es Phe o Leu; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Arg, Lys, Val, o Leu; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly o Glu; Xaa23 es Gln, Glu, Lys, o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Arg o Lys; Xaa27 es Glu, Lys, o Leu; Xaa30 es Ala, Glu, o Arg; Xaa31 es Trp, Lys, o His; Xaa33 es Val, Lys, o Arg; Xaa34 es Lys, Arg, His, Asn, o Gln; Xaa35 es Gly o Ala; Xaa36 es Arg, Lys, o Gly; Xaa37 es Gly o Pro; Xaa38 es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, o Lys; Xaa39 es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; Xaa40 es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; Xaa41 es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; y Xaa42 es Lys; con la condición de que al menos uno de Xaa18, Xaa23, Xaa27, Xaa31, Xaa36, o Xaa38 es Lys; en donde Lys en Xaa42 es un primer residuo K, y una Lys en uno de Xaa18, Xaa23, Xaa27, Xaa31, Xaa36, o Xaa38 es un segundo residuo K; y el derivado comprende una primera y una segunda porción de prolongación conectadas a dichos primer y segundo residuos K, respectivamente, en donde la primera y la segunda porción de prolongación es de fórmula quí. 1: HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO-\*, Quím. 1a: HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CO-\*, o Quím. 1b: HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>20</sub>-CO-\*; o una sal farmacéuticamente aceptable, amida, o éster del mismo.

En su segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable; y el uso del derivado o análogo de la invención como un medicamento, en particular para usar en (i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como hiperglicemia, diabetes tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, diabetes no dependiente de insulina, MODY (diabetes del adulto de inicio juvenil), diabetes gestacional, y/o para la reducción de HbA1C; (ii) retraso o prevención de la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retraso de la progresión de la alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT) a diabetes tipo 2 dependiente de insulina, retraso o prevención de la resistencia a la insulina, y/o retraso de la progresión de la diabetes tipo 2 no dependiente de insulina a diabetes tipo 2 dependiente de insulina; (iii) mejoramiento de 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 las células β, y/o para la restauración de la sensibilidad a la glucosa para las células β; (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y/o la esclerosis múltiple; (v) prevención y/o tratamiento de trastornos de la alimentación, tales como la obesidad, por ejemplo mediante la disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratamiento o prevención del trastorno por atracones, bulimia nervosa, y/u obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la motilidad gástrica; retraso del vaciado gástrico; aumento de la movilidad física; y/o prevención y/o tratamiento de comorbilidades de la obesidad, tales como osteoartritis y/o incontinencia urinaria; (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía; neuropatía, que incluye neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía; (vii) mejoramiento de los parámetros lipídicos, tales como prevención y/o tratamiento de la dislipidemia, disminución los lípidos totales en suero; aumento de HDL; disminución de la LDL pequeña, densa; disminución de VLDL; disminución de los triglicéridos; disminución del colesterol; disminución de los niveles plasmáticos de lipoproteína A (Lp(a)) en un ser humano; inhibición de la generación de apolipoproteína A (apo(A)) in vitro y/o in vivo; (viii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión del stent, claudicación intermitente (aterosclerosis ocluyentes), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica; (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tales como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide y/o lupus eritematoso sistémico; (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas, tales como tratamiento de un paciente críticamente enfermo, un paciente con una polineuropatía (CIPNP) crítica, y/o un paciente con una posible CIPNP; prevención del desarrollo de enfermedad crítica o CIPNP; prevención, tratamiento y/o cura del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente padezca de bacteriemia, septicemia, y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa en sangre, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes con enfermedades agudas en las unidades de cuidados intensivos; (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS); (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral, y/o daño traumático del cerebro; (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o (xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.

Un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 comprende los siguientes cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (sec. con núm. de ident.: 1):

65 i) (8Aib, 22E, 26R, 27K, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); ii) (8Aib, 22E, 26R, 31K, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); iii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K); iv) (8Aib, 22E, 23K, 26R, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); v) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); vi) (8Aib, 18K, 22E, 26R, 34R, 38G, 39G, 40G, 41S, 42K); vii) (7Imp,

8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K); iix) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38A, 39E, 40S, 41P, 42K); ix) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38E, 39G, 40P, 41A, 42K); x) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 36K, 38P, 39A, 40S, 41E, 42K); xi) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39P, 40E, 41G, 42K) (sec. con núm. de ident.: 12); xii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39S, 40A, 41E, 42K); o xiii) (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39S, 40P, 41E, 42K); o se selecciona de estos análogos.

5

#### Agonista de receptor de GLP-1

Un agonista de receptor puede definirse como un análogo que se une a un receptor y provoca una respuesta típica del ligando natural. Un agonista total puede definirse como uno que provoca una respuesta de la misma magnitud que el ligando natural (véase por ejemplo "Principles of Biochemistry", AL Lehninger, DL Nelson, MM Cox, Segunda Edición, Worth Publishers, 1993, página 763).

Así, por ejemplo, un "agonista del receptor de GLP-1" puede definirse como un compuesto que es capaz de unirse al receptor de GLP-1 y es capaz de activarlo. Y un agonista "total" del receptor de GLP-1 puede definirse como un agonista del receptor de GLP-1 que es capaz de provocar una respuesta del receptor GLP-1 de magnitud similar al GLP-1 nativo.

#### Características estructurales

Péptidos similares a GLP-1 y análogos de GLP-1

El término "péptido similar a GLP-1" como se usa en la presente descripción puede referirse a un análogo (o variante) del péptido 1 similar al glucagón humano, (GLP-1(7-37)), cuya secuencia 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".

El péptido similar a GLP-1 puede definirse mediante la siguiente fórmula I:

Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Xaa<sub>18</sub>-Xaa<sub>19</sub>-Xaa<sub>20</sub>-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Xaa<sub>25</sub>-Xaa<sub>26</sub>-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-Xaa<sub>30</sub>-Xaa<sub>31</sub>-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>-Xaa<sub>38</sub>-Xaa<sub>39</sub>-Xaa<sub>40</sub>-Xaa<sub>41</sub>-Xaa<sub>42</sub>,

en donde Xaa<sub>7</sub> es L-histidina, ácido (S)-2-hidroxi-3-(1H-imidazol-4-il)-propiónico, D-histidina, desamino-histidina, homohistidina, N<sup>α</sup>-acetil-histidina, N<sup>α</sup>-formil-histidina, N<sup>α</sup>-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina; Xaa<sub>8</sub> es Ala, Gly, Ser, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, o ácido (1-aminociclobutil)carboxílico; Xaa<sub>12</sub> es Phe o Leu; Xaa<sub>16</sub> es Val o Leu; Xaa<sub>18</sub> es Ser, Arg, Lys, Val, o Leu; Xaa<sub>19</sub> es Tyr o Gln; Xaa<sub>20</sub> es Leu o Met; Xaa<sub>22</sub> es Gly o Glu; Xaa<sub>23</sub> es Gln, Glu, Lys, o Arg; Xaa<sub>25</sub> es Ala o Val; Xaa<sub>26</sub> es Arg o Lys; Xaa<sub>27</sub> es Glu, Lys, o Leu; Xaa<sub>30</sub> es Ala, Glu, o Arg; Xaa<sub>31</sub> es Trp, Lys, o His; Xaa<sub>33</sub> es Val, Lys, o Arg; Xaa<sub>34</sub> es Lys, Arg, His, Asn, o Gln; Xaa<sub>35</sub> es Gly o Ala; Xaa<sub>36</sub> es Arg, Lys, o Gly; Xaa<sub>37</sub> es Gly o Pro; Xaa<sub>38</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, o Lys; Xaa<sub>39</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; Xaa<sub>40</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; Xaa<sub>41</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, o Pro; y Xaa<sub>42</sub> es Lys; con la condición de que al menos uno de Xaa<sub>18</sub>, Xaa<sub>23</sub>, Xaa<sub>27</sub>, Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, o Xaa<sub>38</sub> sea Lys.

En esta fórmula la numeración de los residuos de aminoácidos sigue la práctica establecida en la técnica para el GLP-1 nativo, específicamente que el primer residuo de aminoácido (N-terminal) se enumera o se acuerda que sea la posición núm. 7, y los residuos de aminoácidos que le siguen en dirección hacia el C-terminal se enumeran 8, 9, 10, y así sucesivamente, hasta el último residuo de aminoácido (C-terminal), que en el GLP-1 nativo es Gly con número 37, sin embargo, el péptido de la fórmula I tiene una cola o extensión C-terminal, como se definió en la fórmula, hasta la posición 42 y que la incluye.

La numeración se realiza de manera diferente en el listado de secuencias, donde al primer residuo de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 1 (His) se le asigna el núm. 1, y al último (Gly) el núm. 31, y viceversa para las otras secuencias de GLP-1 del listado de secuencias. Sin embargo, en la presente descripción nosotros seguimos la práctica de numeración establecida en la técnica, como se explicó anteriormente.

Cada uno de 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.

En otras palabras, el análogo de GLP-1 de la invención puede describirse mediante referencia al péptido GLP-1(7-37) nativo, específicamente como una variante del mismo en la cual se han cambiado varios residuos de aminoácidos, cuando se compara con 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 adecuada de los análogos:

El péptido similar a GLP-1 incorporado en el derivado del Ejemplo 3 en la presente descripción puede referirse como

el siguiente análogo de GLP-1: (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K) GLP-1(7-37). Esto significa que cuando este análogo se alinea con GLP-1 nativo, tiene i) un Aib en la posición en el análogo que corresponde, de acuerdo con el alineamiento, a la posición 8 en GLP-1 nativo, ii) un E en la posición en el análogo, que corresponde a la posición 22 en GLP-1 nativo, iii) un R en la posición en el análogo que corresponde a la posición 26 en GLP-1 nativo, iv) una R en la posición en el análogo que corresponde a una posición 34 en GLP-1 nativo, v) una K en la posición en el análogo que correspondería a la posición 38 en GLP-1 nativo (si se extiende en el extremo C-terminal), vi) una G en la posición en el análogo que correspondería a la posición 39 en GLP-1 nativo (si se extiende en el extremo C-terminal), vii) una G en la posición en el análogo que correspondería a la posición 40 en GLP-1 nativo (si se extiende en el extremo C-terminal), viii) una S en la posición en el análogo que correspondería a la posición 41 en GLP-1 nativo (si se extiende en el extremo C-terminal), y ix) una K en la posición en el análogo que correspondería a la posición 42 en GLP-1 nativo (si se extiende en el extremo C-terminal). Todos los otros aminoácidos en este análogo son idénticos a los aminoácidos correspondientes en GLP-1 nativo. Como se explicó anteriormente, el péptido similar a GLP-1 de la invención puede definirse mediante cambios de aminoácidos cuando se compara con GLP-1 nativo. Los cambios de aminoácidos analizados anteriormente pueden considerarse como sustituciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos, con respecto al GLP-1 nativo. En este ejemplo las adiciones son en el extremo C-terminal, y pueden, por lo tanto, referirse como extensiones C-terminal. Por ejemplo, 38K se refiere al aminoácido K que se encuentra en la posición C-terminalmente próxima a la que corresponde a la posición 37 en GLP-1 nativo, cuando el análogo se alinea con GLP-1 nativo. Y después sigue G en la próxima posición C-terminalmente en la posición en el análogo que correspondería a la posición 39 del GLP-1 nativo; y otro G en la posición posterior C-terminalmente, en la posición en el análogo que correspondería a la posición 40 del GLP-1 nativo; y una S en la posición posterior C-terminalmente, en la posición en el análogo que correspondería a la posición 41 del GLP-1 nativo, y finalmente una K en la posición que correspondería a la posición 42 del GLP-1 nativo.

La fórmula general I debe entenderse de manera similar.

Al menos uno de Xaa<sub>18</sub>, Xaa<sub>23</sub>, Xaa<sub>27</sub>, Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, o Xaa<sub>38</sub> en la fórmula I es Lys. El péptido similar a GLP-1 comprende al menos un residuo de Lys adicional, específicamente en la posición 42 (Xaa<sub>42</sub>). Este último (pos. 42) puede referirse como el primer residuo K, y el anterior, es decir una Lys en uno de Xaa<sub>18</sub>, Xaa<sub>23</sub>, Xaa<sub>27</sub>, Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, o Xaa<sub>38</sub>, puede referirse como el segundo residuo K. El primer y el segundo residuo K constituyen dos sitios de acilación del derivado de la invención doblemente acilado. El péptido similar a GLP-1 puede comprender residuos adicionales de Lys, como está claro a partir de la Fórmula I. En una modalidad particular el péptido similar a GLP-1 de la invención tiene solo dos residuos de Lys.

Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender cambios adicionales, cuando se comparan con la sec. con núm. de ident.: 1. En una modalidad particular, el análogo "tiene" los cambios especificados.

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.

Las expresiones "una posición equivalente a" o "posición correspondiente" pueden usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia de GLP-1(7-37) como referencia a una secuencia de referencia tal como GLP-1(7-37) nativo (sec. con núm. de ident.: 1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como también 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 se basa en un algoritmo 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 BLOSUM62 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 los residuos adicionales en una interrupción en -2 o preferentemente en -0,5.

Un ejemplo de tal alineamiento se inserta a continuación, en el cual la secuencia núm. 1 es la sec. con núm. de ident.: 1, y la secuencia núm. 2 es el análogo (8Aib, 22E, 26R, 34R, 38K, 39G, 40G, 41S, 42K) de este:

```
# Secuencias alineadas: 2
# secuencia 1: 1
# secuencia 2: 2
# Matriz: EBLOSUM62
# Penalización_interrupción: 10,0
# Penalización_extendida: 0,5
```

## ES 2 713 185 T3

#

# Longitud: 36

5

# Identidad: 27/36 (75,0 %)

# Similitud: 29/36 (80,6 %)

10 # Interrupciones: 5/36 (13,9 %)

# Puntuación: 143,0

15

```
1 1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG----- 31
```

```
|.|||||||||||||.|||:|||||||:||||
```

```
2 1 HXEGTFTSDVSSYLEEQAAAREFIAWLVRGRGKGGSK 36
```

20

Cuando 6 se añade a los números de posición que se muestran en este alineamiento (es decir, a "1" y "31" en la secuencia 1, y a "1" y "37" en la secuencia 2) se obtiene la numeración de posición como se usa en la presente descripción. Por ejemplo, en la secuencia 1 (que es idéntica a la sec. con núm. de ident.: 1), el aminoácido N-terminal (H) tiene la posición número 7, y el aminoácido C-terminal (G) tiene el número 37. En cuanto a la secuencia 2, el aminoácido N-terminal (H) tiene el número 7 y el aminoácido C-terminal (K) tiene el número 42.

25

En el caso específico de que residuos de aminoácidos o similares que no tienen codón de una letra (tal como Aib) se incluyan en la secuencia, estos pueden, con propósitos de alineamiento, reemplazarse, por ejemplo, con X, como se muestra en el alineamiento anterior. Si se desea, X puede corregirse manualmente más tarde.

30

Los siguientes son ejemplos no limitantes de lo que puede inferirse a partir del alineamiento anterior:

35

Como un ejemplo puede inferirse que la secuencia 2 tiene 9 cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia 1 (específicamente en todas aquellas posiciones donde se muestra en el alineamiento un punto ("."), dos puntos (":"), o un guion horizontal ("-").

Como otro ejemplo puede inferirse que, por ejemplo, la secuencia núm. 2 comprende 38K, dado que tiene una K en la posición que corresponde, de acuerdo con el alineamiento, a la posición 38 en la secuencia de referencia (secuencia 1, sec. con núm. de ident.: 1).

40

Y de manera similar todos los otros cambios en la secuencia 2 en comparación con la secuencia 1 pueden deducirse a partir del alineamiento.

45

El término "péptido", como se usa, por ejemplo, en el contexto de los péptidos semejantes a 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).

El péptido comprende al menos 36 aminoácidos. En una modalidad particular, el péptido consiste en 36 aminoácidos. En una modalidad particular adicional, el péptido consiste en 36 aminoácidos.

50

Aún en otra modalidad particular, el péptido consiste en aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

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

55

El término "aminoácido" incluye aminoácidos proteinogénicos (o naturales) (entre ellos los 20 aminoácidos estándar), así como también aminoácidos no proteinogénicos (o no naturales). Los aminoácidos proteinogénicos son los que se incorporan naturalmente a las proteínas. Los aminoácidos estándar son los codificados por el código genético. Los aminoácidos no proteinogénicos no se encuentran en las proteínas, o no se producen por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haber sufrido modificaciones postraduccionales). Ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinogénicos son Aib (ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, o ácido 2-aminoisobutírico), des-amino-histidina (nombre alternativo del ácido imidazopropiónico o ácido 3-(imidazol-5-il)propanoico, abreviado Imp), así como también los isómeros D de los aminoácidos proteinogénicos.

60

65

En lo que sigue, cada aminoácido de los péptidos de GLP-1 para los cuales no se indica el isómero óptico debe entenderse que significa el isómero L (a menos que se especifique de otra manera).

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 insulino-trópica u otros efectos fisiológicos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los análogos y derivados de la invención pueden probarse para determinar la actividad de GLP-1 mediante el uso de los ensayos que se describen en los Ejemplos 29, 30, 32, o 33 en la presente descripción.

Derivados de péptidos similares a GLP-1

El término "derivado de GLP-1" generalmente se refiere a un compuesto que puede prepararse a partir del péptido GLP-1 nativo o un análogo de este mediante modificación química, en particular mediante unión covalente de uno o más sustituyentes. El derivado de un péptido similar a GLP-1 de acuerdo con la invención comprende dos de tales sustituyentes. Cada uno de ellos puede referirse, también o alternativamente, como una cadena lateral.

En una modalidad particular, la cadena lateral es capaz de formar complejos no covalentes con albúmina, lo que promueve de esta manera la circulación del derivado en el torrente sanguíneo, y tienen, además, el efecto de prolongar el tiempo de acción del derivado, debido al hecho de que el complejo del derivado de GLP-1 y la albúmina se desintegra sólo lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo. Así, el sustituyente, o la cadena lateral como un todo, se refiere preferentemente, como una porción de unión a albúmina.

En otra modalidad particular la porción de unión a albúmina comprende una porción que es particularmente relevante para la unión a la albúmina y de esta manera la prolongación, cuya porción, en consecuencia, puede referirse como una porción de prolongación. La porción de prolongación puede estar cerca, o preferentemente en el extremo terminal (o distal, o libre) de la porción de unión a la albúmina, en relación con su punto de unión al péptido. La porción de unión a la albúmina se une al péptido mediante acilación de un residuo de lisina del péptido, en particular mediante acilación al grupo épsilon amino del residuo de lisina.

Aún en otra modalidad particular la porción de unión a la albúmina comprende una porción entre la porción de prolongación y el punto de unión al péptido, cuya porción puede referirse como un enlazador, una porción de enlazador, un espaciador o similares.

Los derivados comprenden una primera y una segunda porción de prolongación de fórmula Quím. 1, Quím. 1a, o Quím. 1b:



que puede referirse, además, como diácido C20, diácido C19, y diácido C22, respectivamente. La primera porción de prolongación se conecta al primer residuo K, y la segunda porción de prolongación se conecta al segundo residuo K. El término "conectado" está destinado a incluir uniones directas así como también indirectas. Un ejemplo de unión indirecta es la unión por medio de un enlazador situado entre la porción de prolongación y el residuo K. Un ejemplo de unión directa es cuando no interviene tal enlazador.

Así, en una modalidad particular la primera porción de prolongación se une al primer residuo K, y la segunda porción de prolongación se une al segundo residuo K, opcionalmente por medio de un primer y un segundo enlazador, respectivamente.

El primer enlazador y el segundo pueden comprender un elemento\_1, que es un dirradical Glu de fórmula Quím. 2:

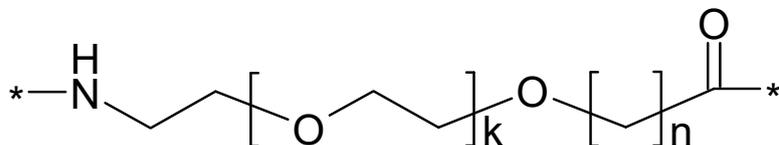
Quím. 2:



Este elemento puede referirse como gamma-Glu, o brevemente gGlu, debido al hecho de que es el grupo gamma carboxilo del aminoácido ácido glutámico el que se usa aquí para la conexión a otro elemento enlazador, o al grupo épsilon amino de lisina, como puede ser el caso.

Además, o alternativamente, el primer y el segundo enlazador pueden comprender un elemento\_2 de fórmula Quím. 3:

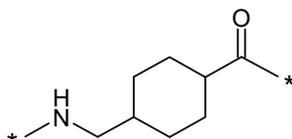
Quím. 3:



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, el Quím. 3 elemento\_2 puede designarse OEG, o un dirradical de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico. En una modalidad particular adicional no limitante k=3 y n=2, en tal caso el grupo del elemento\_2 del Quím. 3 puede designarse como dPEG4.

Además, o alternativamente, el primer y el segundo enlazador pueden comprender un elemento\_3 de fórmula quím. 4, que puede referirse como Trx (para ácido tranexámico):

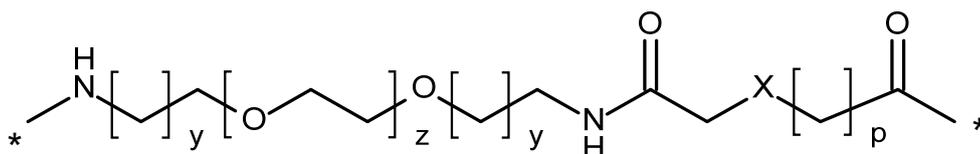
Quím. 4:



Además, o alternativamente, el primer y el segundo enlazador pueden comprender un elemento\_4 de fórmula Quím. 5:  $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}[(\text{CH}_2)_w\text{NH}_2]-\text{CO}-*$ , en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, y w es un número entero en el intervalo de 0-5, con las condiciones de que cuando w es 0 q es un número entero en el intervalo de 1-5, y cuando q es 0 w es un número entero en el intervalo de 1-5.

Además, o alternativamente, el primer y el segundo enlazador pueden comprender un elemento\_5 de fórmula Quím. 6:

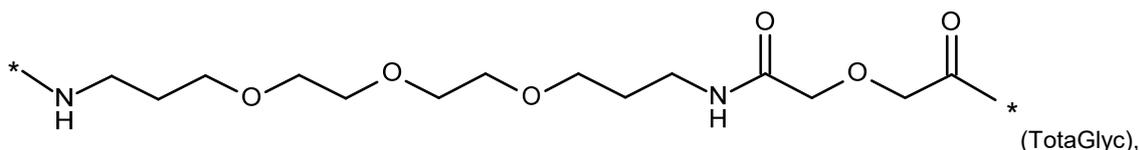
Quím. 6:



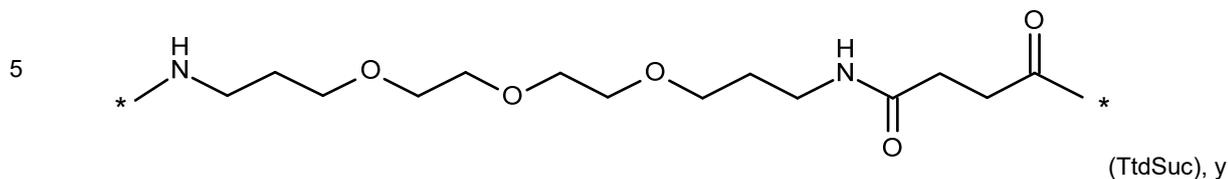
en donde y es 1 o 2, z es 1 o 2, p es 0 o 1, y X designa un átomo de carbono o un átomo de oxígeno.

Modalidades particulares no limitantes del elemento\_5 son Quím. 7, Quím. 8 y Quím. 9:

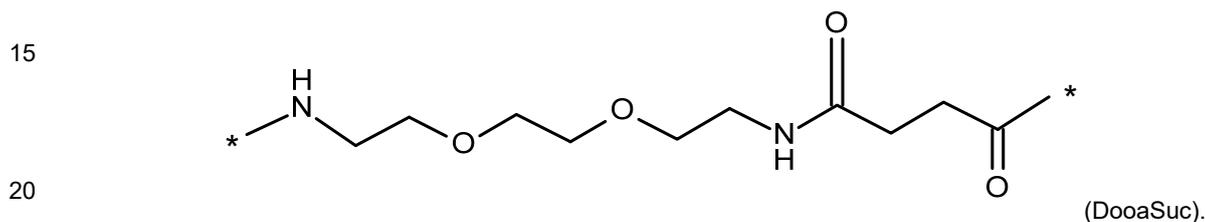
Quím. 7:



Quím. 8:



Quím. 9:



Además, o alternativamente, el primer y el segundo enlazador pueden comprender un elemento\_6 de fórmula Quím. 10:

Quím. 10:



35 La primera y la segunda porciones de prolongación se conectan al primer y al segundo enlazadores, respectivamente, y a su vez al primer y al segundo residuo K, respectivamente, del péptido similar a GLP-1 por medio de enlaces amida.

40 El primer y el segundo enlazador pueden comprender uno o más de diversos elementos como se definió anteriormente (elemento\_1 al elemento\_6), cada elemento puede ocurrir una o más veces, y además la secuencia de los elementos puede variar.

45 Siempre que se dice que un enlazador "comprende" un determinado elemento, éste puede, adicionalmente, contener otros elementos, mientras que el término "incorpora" significa lo mismo que "tiene" o "incluye solo". Por lo tanto, un enlazador que "incorpora" dos elementos\_2 de fórmula Quím. 3 tiene solo dos de estos elementos en su estructura.

La secuencia en que los elementos se indican aquí es generalmente a partir del extremo N-terminal al extremo C-terminal.

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

La primera y la segunda porciones de prolongación, son similares, preferentemente sustancialmente idénticas, o, con la máxima preferencia, idénticas.

55 El primer y el segundo enlazador, son similares, preferentemente sustancialmente idénticos, o, con la máxima preferencia, idénticos.

60 El término "sustancialmente idéntico" incluye diferencias de identidad que se deben a la formación de uno o más ésteres y/o amidas; preferentemente a la formación de uno o más ésteres metílicos, y amidas simples; con mayor preferencia a la formación de no más de dos ésteres metílicos, y/o amidas simples; o con la máxima preferencia a la formación de no más de un éster metílico, y/o amida simple.

65 En el contexto de los compuestos químicos tales como porciones de unión a albúmina, porciones de prolongación y enlazadores, 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 enlazadores, y/o dos cadenas laterales completas puede determinarse adecuadamente mediante el uso de huellas moleculares. Las huellas constituyen un método matemático para representar una estructura química (ver por ejemplo Chemoinformatics: A textbook, Johann Gasteiger y Thomas Engel (Eds), Wiley-VCH Verlag, 2003).

5 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).

10 En modalidades particulares, las dos porciones de prolongación, los dos enlazadores, y/o las dos cadenas laterales completas se representan como a) huellas ECFP\_6; b) huellas UNITY; y/o c) huellas MDL.

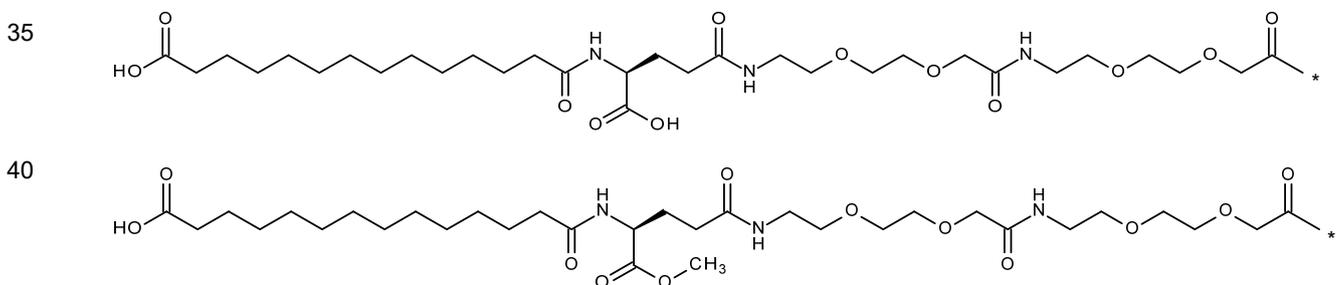
El coeficiente de Tanimoto se usa preferentemente para calcular la similitud de las dos huellas, se usa ya sea a), b), o c).

15 En modalidades particulares, se use ya sea a), b) o c), las dos porciones de prolongación, los dos enlazadores, 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 %).

20 Las huellas UNITY pueden calcularse mediante el uso del programa SYBYL (comercializado por 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 (comercializado por Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, Estados Unidos).

25 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](http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf) y [http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL\\_072505.pdf](http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf).

Un ejemplo de un cálculo de similitud se inserta a continuación, en el cual una cadena lateral completa conocida de un derivado de GLP-1 se comparó con un éster de metilo de este:



45 Mediante el uso de a) las huellas ECFP\_6 la similitud es 0,798, b) mediante el uso de las huellas UNITY la similitud es 0,957; y mediante el uso de las huellas MDL la similitud es 0,905.

50 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, incluso con mayor preferencia al menos 0,95, o con la máxima preferencia al menos 0,99.

55 Los derivados de la invención pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas que tienen la misma fórmula molecular y la secuencia de átomos unidos, pero 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 otra manera la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas del derivado reivindicado.

60 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 Luminiscencia con Canalización de Oxígeno). Los protocolos generales para ensayos RIA y ELISA adecuados se encuentran, por ejemplo, en el documento WO 2009/030738 en las págs. 116-118. Un ensayo preferido es el ensayo LOCI, donde LOCI se refiere a Inmunoensayo de Luminiscencia con

65

- Canalización de Oxígeno, que generalmente se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal de Biomolecular Screening 2007, vol. 12, págs. 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. Se biotiniló otro anticuerpo monoclonal, específico para el N-terminal. 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 perlasceptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz fue proporcional a la concentración del compuesto.
- 5
- 10 Sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable
- Los derivados de la invención pueden estar en forma de una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable.
- Las sales se forman, por ejemplo, mediante una reacción química entre una base y un ácido, por ejemplo:  $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
- 15
- 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.
- 20 Las sales de los derivados de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos entre los 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.
- 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 internos tales como Asp y Glu.
- 25
- 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.
- 30
- En una modalidad particular los derivados de la invención son sales básicas. Las sales pueden, por ejemplo, formarse entre grupos aniónicos en la porción peptídica y añadir cationes sodio o potasio.
- 35
- El éster de los derivados de la invención puede formarse, por ejemplo, mediante la reacción de un grupo de ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que conduce al reemplazo de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi.
- 40
- La formación de éster puede implicar al grupo carboxílico libre en el C-terminal del péptido, y/o cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral.
- 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.
- 45
- La formación de amida puede implicar al 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 en la cadena lateral.
- 50
- En una modalidad particular, el péptido o su derivado tienen forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad particular, el derivado tiene forma de una amida farmacéuticamente aceptable, preferentemente con un grupo amida en el C-terminal del péptido. Aún en otra modalidad particular, el péptido o su derivado están en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable.
- 55
- Propiedades funcionales
- En una modalidad particular los derivados de la invención tienen un tiempo de vida media muy largo y al mismo tiempo una potencia muy buena in vitro e in vivo, que los hace potencialmente adecuados para su administración una vez al mes.
- 60
- Así, en un primer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen una buena potencia. Además, o alternativamente, en un segundo aspecto, se unen muy bien al receptor de GLP-1, por ejemplo a una alta concentración de albúmina. Preferentemente son potentes agonistas del receptor de GLP-1, como se refleja por sus capacidades para unirse fuertemente al receptor de GLP-1, combinado con la capacidad para activar el receptor. Además, o alternativamente, en un tercer aspecto funcional, tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas.
- 65

Actividad Biológica- potencia in vitro

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

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

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

15 Por ejemplo, la respuesta del receptor de GLP-1 humano puede medirse en un ensayo de gen reportero, por ejemplo en una línea de células BHK transfectadas establemente que expresan el receptor de GLP-1 humano y contienen el ADN para el elemento de respuesta de cAMP (CRE) acoplado a un promotor y el gen para luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). Cuando se produce cAMP como resultado de la activación del receptor de GLP-1, esto a su vez da como resultado que se exprese la luciferasa. La luciferasa puede determinarse mediante la adición de luciferina, que se convierte a oxiluciferina mediante la enzima y produce bioluminiscencia, que se mide y es una medida de la potencia in vitro. Un ejemplo no limitante de tal ensayo se describe en el ejemplo 29.

20 El término concentración media eficaz máxima (EC<sub>50</sub>) generalmente se refiere a la concentración que induce una respuesta intermedia entre la línea de base y el máximo, referente a la curva de dosis respuesta. EC<sub>50</sub> 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 EC<sub>50</sub> del derivado en cuestión. A menor valor de EC<sub>50</sub>, mejor la potencia.

30 En una modalidad particular, los derivados de la invención son muy potentes, a pesar del hecho de que tienen tiempos de vida media muy largos. En una modalidad particular, el derivado de la invención tiene una potencia in vitro que se determina mediante el uso del método del Ejemplo 29 correspondiente a una EC<sub>50</sub> de 400 pM o por debajo de este valor.

Actividad biológica - farmacología in vivo

35 En otra modalidad particular los derivados de la invención, así como también los péptidos similares a GLP-1 constituyentes como tales, son potentes in vivo, lo cual puede determinarse, como se conoce en la técnica, en cualquier modelo animal adecuado, así como también en ensayos clínicos.

40 El ratón db/db diabético es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y el efecto de disminución de la glucosa en sangre y/o de la disminución del peso corporal pueden determinarse en tales ratones in vivo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 32. En una modalidad particular los derivados de la invención son capaces de disminuir la glucosa en sangre y el peso corporal en ratones db/db hasta 96 horas al menos.

45 El cerdo LYD es otro ejemplo de un modelo animal adecuado, y la reducción de la ingesta de alimentos puede determinarse en un estudio PD en dichos cerdos in vivo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 33.

50 En una modalidad particular los derivados de la invención son muy potentes in vivo y durante un tiempo largo, lo cual se evidencia por los resultados obtenidos en la parte experimental y referidos en la sección titulada "Modalidades particulares".

Actividad biológica - Unión al receptor in vitro

55 De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los derivados de la invención, así como también los péptidos similares a GLP-1 constituyentes, como tales, se unen muy bien al receptor de GLP-1, por ejemplo, a una alta concentración de albúmina. Esto puede determinarse como se describe en el Ejemplo 30.

Generalmente, la unión al receptor de GLP-1 a baja concentración de albúmina debe ser tan buena como sea posible, correspondiente a un bajo valor de IC<sub>50</sub>.

60 El valor de IC<sub>50</sub> a una alta concentración de albúmina refleja la influencia de la albúmina sérica en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Como se conoce, los derivados de GLP-1 pueden unirse a la albúmina sérica y, si ése es el caso, entonces el valor de IC<sub>50</sub> con la albúmina sérica alta será mayor que el valor de IC<sub>50</sub> con la albúmina baja. Un valor aumentado de IC<sub>50</sub> con albúmina sérica alta representa una unión reducida al receptor de GLP-1 provocada por la unión de la albúmina sérica que compite con la unión al receptor de GLP-1.

65 En una modalidad particular, los derivados de la invención se unen muy bien al receptor de GLP-1 con una concentración baja de albúmina, pero también se unen muy bien con una concentración alta de albúmina.

Como un ejemplo, en una modalidad particular, la afinidad de unión al receptor de GLP-1 ( $IC_{50}$ ) de los derivados de la invención en presencia de una baja concentración de HSA (baja albúmina) es de 5,0 nM o más baja.

5 Perfil farmacocinético

De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como un aumento del tiempo de vida media terminal, y/o una disminución de la eliminación.

10 El aumento del tiempo de vida media terminal y/o la disminución de la eliminación significa que el compuesto en cuestión se elimina del cuerpo más lentamente. Para los derivados de la invención esto conlleva una extensión de la duración del efecto farmacológico.

15 Las propiedades farmacocinéticas de los derivados de la invención pueden determinarse adecuadamente in vivo en estudios farmacocinéticos (PK). Dichos estudios se realizan para evaluar cómo se absorben, se distribuyen y se eliminan los compuestos farmacéuticos en el cuerpo, y cómo estos procesos afectan la concentración del compuesto en el cuerpo, en el transcurso del tiempo.

20 En la fase de descubrimiento y preclínica del desarrollo de un fármaco, pueden usarse modelos animales tales como ratón, rata, mono, perro, o cerdo, para realizar esta caracterización. Cualquiera de estos modelos puede usarse para probar las propiedades farmacocinéticas de los derivados de la invención.

25 En tales estudios, típicamente a los animales se les administra una dosis única del fármaco, ya sea por vía intravenosa (i.v.), por vía subcutánea (s.c.), o por vía oral (p.o.) en una formulación relevante. Se extraen las muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos después de la dosificación, y las muestras se analizan para determinar la concentración del fármaco con un ensayo cuantitativo relevante. Sobre la base de estas mediciones, se representan los perfiles de concentración plasmática contra tiempo para el compuesto del estudio y se realiza un denominado análisis farmacocinético no compartimental de los datos.

30 Para la mayoría de los compuestos, la parte terminal de los perfiles de concentración plasmática será lineal cuando se dibuje en una gráfica semilogarítmica, que refleja que después de la absorción y distribución inicial, el fármaco se elimina del cuerpo a una tasa fraccional constante. La tasa ( $\lambda_z$  o  $\lambda_{z'}$ ) es igual a menos la pendiente de la parte terminal de la gráfica. A partir de esta tasa, puede calcularse, además, una vida media terminal, como  $t_{1/2} = \ln(2) / \lambda_z$  (ver, por ejemplo, Johan Gabrielsson y Daniel Weiner: *Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications*, 3ra Ed., Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo (2000)).

35 La eliminación puede determinarse después de la administración i.v. y se define como la dosis (D) dividida entre el área bajo la curva (AUC) en el perfil de concentración plasmática contra tiempo (Rowland, M y Tozer TN: *Clinical Pharmacokinetics: Concepts y Applications*, 3ª edición, 1995 Williams Wilkins).

40 La estimación del tiempo de vida media terminal y/o la eliminación es relevante para la evaluación de los regímenes de dosificación y es un parámetro importante en el desarrollo de un fármaco, en la evaluación de nuevos fármacos.

45 Perfil farmacocinético - tiempo de vida media in vivo en minicerdos

De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas.

50 En una modalidad particular, las propiedades farmacocinéticas pueden determinarse como tiempo de vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) in vivo en minicerdos después de la administración i.v., por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 31 en la presente descripción.

55 En una modalidad particular los derivados de la invención tienen un excelente tiempo de vida media terminal en minicerdos que los hace adecuados para una administración una vez al mes. En una modalidad particular, el tiempo de vida media terminal de los derivados de la invención en minicerdos después de la administración i.v. es al menos 90 horas.

60 Se describen modalidades particulares adicionales de los derivados de la invención en la sección titulada "Modalidades particulares", antes de la sección experimental.

65 Procesos de producción

La producción de péptidos similares a GLP-1 (7-37) y análogos de GLP-1 se conoce bien en la técnica.

La porción de péptido similar a GLP-1 de los derivados de la invención (o sus fragmentos) 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, ellos 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. Ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas para la expresión de estos péptidos son: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también, líneas celulares BHK de mamíferos o CHO.

Aquellos derivados de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o un monopéptido o dipéptido mimético 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

La invención se refiere además a 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. Dichas composiciones pueden prepararse como se conoce en la técnica.

El término "excipiente" se refiere, en sentido amplio, a cualquier componente aparte de los ingredientes terapéuticos activos. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente.

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

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

Ejemplos no limitantes de excipientes son: Los solventes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes quelantes y estabilizadores.

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.

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

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.

Una composición farmacéutica puede comprender un tampón. El tampón se selecciona, por ejemplo, de 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 y sus mezclas.

Una composición farmacéutica puede comprender un conservante. El conservante puede seleccionarse, por ejemplo, de fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, 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. Una composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse, por ejemplo, de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y 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, trealosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. El alcohol de 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.
- 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, tensoactivos y/o uno o más inhibidores de proteasas. Ejemplos no limitantes de estos diversos tipos de estabilizadores se describen en lo siguiente.
- 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 ser 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.
- Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados del polipéptido durante el almacenamiento de la composición. El término "base de aminoácidos" 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. Puede estar presente cualquier estereoisómero del aminoácido base (es decir, L, D, o una mezcla de estos).
- Puede añadirse metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o análogos de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina 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 que se selecciona 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 diferentes sales (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 tensoactivo 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 tensoactivos. El término "tensoactivo" se refiere a cualesquiera moléculas o iones que constan de una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El tensoactivo puede seleccionarse, por ejemplo, de tensoactivos aniónicos, tensoactivos catiónicos, tensoactivos no iónicos y/o tensoactivos zwitteriónicos.
- Una composición farmacéutica puede comprender uno o más inhibidores de proteasas, tales como, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y/o benzamidina HCl.
- Los ingredientes adicionales, opcionales, de una composición farmacéutica incluyen, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de relleno, iones metálicos, 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).
- Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de la invención o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de este, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En una modalidad particular, el excipiente comprende un tampón de fosfato y un agente isotónico.
- En otra modalidad particular, el excipiente comprende un tampón de fosfato y propilenglicol *ad* isotónico.
- Aún en otra modalidad particular la invención se refiere a una composición farmacéutica de dosis única para inyección s.c. que comprende (i) un derivado de GLP-1 de la invención o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de este, en una concentración adecuada, (ii) tampón fosfato 8 mM (tal como 1,42 mg/ml de fosfato de disodio dihidratado), (iii) propilenglicol *ad* isotónico, y (iv) que tiene un pH de 7,4.

El término “concentración adecuada” se refiere a una concentración farmacéuticamente relevante, que puede determinarse como se conoce en la técnica.

5 Los ejemplos no limitantes de concentraciones adecuadas corresponden a las dosis administradas que se mencionan más adelante, cuando están contenidas en 1 ml de la composición (es decir, por ejemplo una concentración adecuada puede ser de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml de la composición).

En una modalidad particular, la concentración adecuada es 3 mg/ml.

10

En otra modalidad particular, la concentración adecuada es 30 mg/ml.

Aún en otras modalidades particulares el derivado de GLP-1 es (a) el compuesto del Ejemplo 1, (b) el compuesto del Ejemplo 2, (c) el compuesto del Ejemplo 3, (d) el compuesto del Ejemplo 5, o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de cualquiera de (a)-(d).

15

Además, una composición farmacéutica puede formularse como se conoce en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulíntricos, por ejemplo mediante el uso de una o más de las formulaciones que se describen en el documento WO 2008/145728.

20

Una dosis administrada puede contener de 0,1 mg - 100 mg del derivado, de 1-100 mg del derivado, o de 1-50 mg del derivado.

El derivado puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica. Puede administrarse a un paciente que necesita del mismo en diversos sitios, por ejemplo, en sitios tópicos tales como sitios de piel o mucosas; en sitios que evitan la absorción tales como en una arteria, en una vena, o en el corazón; y en sitios que implican la absorción, tales como en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

25

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, epidérmica; dérmica; transdérmica; conjuntival; uretral; vaginal; rectal; y/u ocular. Una composición puede ser una composición oral, y la vía de administración es oral.

30

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; un comprimido; un comprimido recubierto; una goma de mascar; un enjuague; una cápsula, tales como cápsulas de gelatina duras o suaves; un supositorio; una cápsula rectal; gotas; un gel; una pulverización; un polvo; un aerosol; un inhalante; gotas oculares; un ungüento oftálmico; un enjuague oftálmico; un pesario vaginal; un anillo vaginal; un ungüento vaginal; una solución de inyección; una solución de transformación in situ, tales como la gelificación in situ, el fraguado, la precipitación y la cristalización in situ; una solución de infusión; o como un implante.

35

40

Una composición puede ser un comprimido, opcionalmente recubierto, una cápsula, o una goma de mascar.

Una composición puede combinarse adicionalmente en un portador o sistema de suministro de fármacos, por ejemplo con el fin de 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.

45

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

50

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

55

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 por la vía transmucosal, por ejemplo, por vía bucal.

60

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 tiene que ser estable durante su uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

65

El término “estabilidad física” se refiere a la tendencia del polipéptido a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de la exposición a estrés termo-mecánico y/o a la interacción con interfaces y superficies desestabilizantes (tales como superficies hidrófobas). La estabilidad física de una formulación acuosa de polipéptido puede evaluarse mediante inspección visual y/o mediante mediciones de la turbidez después de exposición 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”.

El término “estabilidad química” se refiere a cambios químicos (en particular covalentes) en la estructura polipeptídica que conducen 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.

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 la prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: Insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, agonistas de glucagón, antagonistas de glucagón, inhibidores de 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 de 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  $\beta$ células; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozilo, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida;  $\beta$ bloqueadores 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  $\alpha$ bloqueadores  $\alpha$  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,  $\beta$ agonistas 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, factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), 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  $\beta$ TR, 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 en la homeostasis lipídica, tal como la banda gástrica o la derivación gástrica.

Indicaciones farmacéuticas

La presente invención se refiere, además, a un derivado de la invención para el uso como un medicamento.

En modalidades particulares, el derivado de la invención puede usarse para los siguientes tratamientos médicos:

(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 a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;

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

(iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;

5 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, la bulimia nerviosa y/o obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la motilidad gástrica; y/o retardar el vaciamiento gástrico; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;

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

15 (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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;

20 (viii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;

25 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;

30 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;

35 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);

40 (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;

45 (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o

(xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.

50 En una modalidad particular la indicación se selecciona del grupo que consiste en (i)-(xiv), tal como las indicaciones (i)-(viii), (x)-(xiii), y/o (xiv), y se relaciona de una manera u otra con la diabetes.

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

55 Aún en otra modalidad particular, la indicación es (i). En una modalidad particular adicional, la indicación es (v). Aún en otra modalidad particular, la indicación es (viii).

Las siguientes indicaciones se prefieren particularmente: Diabetes tipo 2, y/u obesidad.

#### Modalidades particulares

60 Las siguientes son modalidades particulares de la invención:

292. Un derivado de GLP-1 seleccionado de lo siguiente: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31, Quím. 32, Quím. 33, Quím. 34, Quím. 35, Quím. 36, Quím. 37, Quím. 38, Quím. 39, Quím. 40, Quím. 41, Quím. 42, Quím. 43, Quím. 44, Quím. 45, Quím. 46, Quím. 47 y Quím. 48; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de estos.

65

293. Un derivado de GLP-1 seleccionado de las estructuras químicas que se muestran en cualquiera de los Ejemplos 1-28; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
- 5 294. Un derivado de GLP-1 seleccionado de los nombres de derivados de GLP-1 que se muestran en cualquiera de los Ejemplos 1-28; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
298. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 292-294, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 10 299. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 292-294, para el uso como un medicamento.
300. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 292-294, para el uso en
- 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;
- 20 (ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;
- 25 (iii) mejorar la función de las células  $\beta$ , tal como disminuir la apoptosis de las células  $\beta$ , aumentar la función de las células  $\beta$  y/o la masa de células  $\beta$ , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células  $\beta$ ;
- (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;
- 30 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;
- 35 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía;
- 40 (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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;
- 45 (viii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;
- 50 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;
- 55 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;
- 60 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);
- 65 (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;

(xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o

(xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.

5 301. Uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 292-294 para la preparación de un medicamento para

10 (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;

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

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

20 (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;

25 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;

30 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/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; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL; disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;

45 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;

50 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;

(xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);

60 (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;

(xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o

65 (xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.

Las siguientes son modalidades particulares adicionales de la invención:

205. Un derivado de GLP-1 seleccionado de lo siguiente: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27 y Quím. 28; o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
- 5 206. Un derivado de GLP-1 seleccionado de las estructuras químicas que se muestran en cualquiera de los Ejemplos 1-8; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
207. Un derivado de GLP-1 seleccionado de los nombres de derivados de GLP-1 que se muestran en cualquiera de los Ejemplos 1-8; o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de estos.
- 10 211. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 205-207, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.
212. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 205-207, para el uso como un medicamento.
- 15 213. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 205-207, para el uso en
- (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;
- 20 (ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;
- 25 (iii) mejorar la función de las células  $\beta$ , tal como disminuir la apoptosis de las células  $\beta$ , aumentar la función de las células  $\beta$  y/o la masa de células  $\beta$ , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células  $\beta$ ;
- 30 (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;
- (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;
- 35 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía;
- 40 (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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;
- 45 (viii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;
- 50 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;
- 55 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;
- 60 65

- (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);
- (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;
- 5 (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o
- (xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.
- 10 214. Uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 205-207 para la preparación de un medicamento
- (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;
- 15 (ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la 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  $\beta$ , tal como disminuir la apoptosis de las células  $\beta$ , aumentar la función de las células  $\beta$  y/o la masa de células  $\beta$ , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células  $\beta$ ;
- 25 (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;
- (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;
- 30 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/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; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;
- 45 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;
- 50 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;
- 55 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);
- (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;
- 60 (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o
- 65

(xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.

## EJEMPLOS

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

10

Materiales y Métodos

Lista de abreviaturas

15 Aib:  $\alpha$ ácido aminoisobutírico (ácido 2-aminoisobutírico)

AcOH: ácido acético

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: *t*-butiloxicarbonilo

Bom: benciloximetilo

BSA: Albúmina sérica bovina

35 Bzl: bencilo

CAS: Servicio de Resúmenes Químicos

Cl<sub>t</sub>: 2-clorotritilo

40

colidina: 2,4,6-trimetilpiridina

DCM: diclorometano

45 Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno) de etilo

DesH: des-amino histidina (ácido imidazopropiónico o ácido 3-(imidazol-5-il)propanoico), Imp)

50 DIC: diisopropilcarbodiimida

DIPEA: diisopropiletilamina

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

55

DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)

DooaSuc: ácido 8-amino-3,6-dioxaoctyl succinámico

60 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido etilen glicol tetraacético

FCS: Suero de Ternera Fetal

65

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo

	HATU: (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexa fluorofosfato)
5	HBTU: (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio hexafluorofosfato)
	HEPES:                   Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
10	HFIP     1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol o hexafluoroisopropanol
	HOAt:    1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HOBt:    1-hidroxibenzotriazol
15	HPLC:    Cromatografía líquida de alto rendimiento
	HSA:     Albúmina sérica humana
20	IBMX:    3-isobutil-1-metilxantina
	Imp:    Ácido imidazopropiónico o ácido 3-(imidazol-5-il)propanoico) (referido además como des-amino histidina, DesH)
25	Inp:      ácido isonipecótico
	i.v.      por vía intravenosa
	ivDde:   1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
30	IVGTT:                 Prueba de Tolerancia a Glucosa Intravenosa
	LCMS:    Espectroscopía de masas por cromatografía líquida
35	LYD:     Landrace Yorkshire Duroc
	MALDI-MS:            Ver MALDI-TOF MS
	MALDI-TOF MS:
40	Espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de Desorción/Ionización láser asistida por matriz
	MeOH:                metanol
	Mmt:     4-metoxitritilo
45	Mtt:     4-metiltritilo
	NMP:     N-metil pirrolidona
	OBz:     éster de benzoilo
50	OEG:     ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
	OPfp:    pentafluorofenoxi
55	OPnp:    para-nitrofenoxi
	OSu:     Ésteres de O-succinimidilo (ésteres de hidroxisuccinimida)
	OtBu:     éster terc butílico
60	Oxyma Pure®:        Éster etílico del ácido ciano-hidroxiimino-acético
	Pbf:     2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	PBS:     Solución salina tamponada con fosfato
65	PD:      Farmacodinámica

	Pen/Strep:Penicilina/Estreptomicina
5	PK: Farmacocinética
	RP: Fase inversa
	RP-HPLC:Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
10	RT: Temperatura ambiente
	RT: Tiempo de retención
15	s.c.: Vía subcutánea
	SD: Desviación estándar
	SEC-HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión de Tamaño
20	SEM: Error estándar de la media
	SPA: Ensayo de Proximidad por Centelleo
	SPPS: Síntesis de péptidos en fase sólida
25	TBME: terc-butil metil éter
	tBu: terc butilo
30	TFA: ácido trifluoroacético
	TIS: triisopropilsilano
35	TLC: Cromatografía de Capa Delgada
	Tos: tosilato (o pare-toluenosulfonilo)
	TotaGlyc: ácido 13-amino-4,7,10-trioxatridecail diglicolámico
40	Tris: tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
	Trt: trifenilmetilo (tritilo)
45	Trx: ácido tranexámico
	TtdSuc: ácido 13-amino-4,7,10-trioxatridecail succinámico
	UPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento
50	Materiales especiales
	Éster mono-terc-butílico del ácido eicosanodioico
	Éster mono-terc-butílico del ácido docosanodioico
55	Éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico ácido nonadecanodioico
	Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
60	Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioxaoctil succinámico
	Fmoc-ácido 13-amino-4,7,10-trioxatridecail succinámico
	Fmoc-ácido 13-amino-4,7,10-trioxatridecail diglicolámico
65	Fmoc-ácido tranexámico

Fmoc-Lys(Mtt)-OH

Fmoc-Glu-OtBu

5

Boc-Lys(Fmoc)-OH

4-dimetilaminopiridina (DMAP)

10

terc-Butyl metil éter (TBME)

La preparación del éster mono-terc-butílico del ácido eicosanodioico, éster mono-terc-butílico del ácido docosanodioico, y éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico se describe en la sección 2 más adelante, y los once últimos materiales mencionados están disponibles comercialmente.

15

Métodos químicos

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

20

A. Métodos Generales

A1. Métodos de preparación

25

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 (comercializado por, por ejemplo, Novobiochem, ver además W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403). Los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc que se usaron fueron el estándar recomendado: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OtBu, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, o, Fmoc-Val-OH etc. suministradores, por ejemplo Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o Novabiochem. Si no se especifica nada más, se usa la forma L natural de los aminoácidos. 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). En el caso de la adhesión modular de la porción de unión a la albúmina mediante el uso de SPPS, se usaron los siguientes bloques constitutivos protegidos adecuadamente, tales como, pero sin limitarse a: Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, Fmoc-ácido tranexámico, Fmoc-ácido isonipecótico, Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, suministrados, por ejemplo, por Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o Novabiochem. Más adelante se describe cómo pueden prepararse los siguientes compuestos: éster mono-terc-butílico del ácido eicosanodioico, éster mono-terc-butílico del ácido docosanodioico, y éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico. Todas las operaciones que se indican a continuación se realizaron a una escala de síntesis de 250  $\mu$ mol.

30

35

40

45

1. Síntesis de la cadena principal del péptido protegido unido a la resina

50

*Método:* SPPS\_P

SPPS\_P se realizó en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 Estados Unidos) a una escala de 250  $\mu$ mol mediante el uso de un exceso de seis veces de aminoácidos Fmoc (300 mM en NMP con 300 mM de HOAt u Oxyma Pure®) con respecto a la carga de resina, por ejemplo, baja carga de Fmoc-Gly-Wang (0,35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina al 20 % en NMP. El acoplamiento se realizó mediante el uso de 3 : 3 : 3 : 4 aminoácido/(HOAt u Oxyma Pure®)/DIC/colidina en NMP. Se realizaron lavados superiores con NMP y DCM (7 ml, 0,5 min, 2 x 2 cada uno) entre las etapas de desprotección y acoplamiento. Los tiempos de acoplamiento fueron generalmente de 60 minutos. Algunos aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Aib-OH o Boc-His(Trt)-OH estaban "doblemente acoplados", lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 60 min), la resina se drena y se añaden más reactivos (aminoácido, HOAt u Oxyma Pure®, DIC y colidina) y la mezcla se deja reaccionar de nuevo (por ejemplo, 60 minutos).

55

60

*Método:* SPPS\_L

65

SPPS\_L se realizó en un sintetizador de péptidos Liberty basado en microondas de CEM Corp. (Matthews, NC 28106, Estados Unidos) a una escala de 250  $\mu$ mol o 100  $\mu$ mol mediante el uso de un exceso de seis veces de aminoácidos Fmoc (300 mM en NMP con HOAt 300 mM u Oxyma Pure®) en relación con la carga de resina, por ejemplo baja carga Fmoc-Gly-Wang (0,35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina al 5 % en NMP a temperatura hasta 75 °C durante 30 segundos donde después que se drenó la resina y se lavó con NMP se repitió la desprotección de Fmoc esta vez durante 2 minutos a 75 °C. El acoplamiento se realizó mediante el uso de 1: 1 : 1 aminoácido/(HOAt o Oxyma Pure®)/DIC en NMP. Los tiempos y las temperaturas de acoplamiento fueron generalmente de 5 minutos a temperatura hasta 75 °C. Para reacciones a mayor escala se usaron tiempos de acoplamiento más largos, por ejemplo, 10 min. Los aminoácidos histidina estaban doblemente 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 minutos y después se calentaron a 75 °C durante 5 min. Algunos aminoácidos, tales como, pero sin limitarse a Aib, estaban “doblemente 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 u Oxyma Pure® y DIC) y la mezcla se calienta de nuevo (por ejemplo, 5 minutos a 75 °C). Se realizaron lavados con NMP (5 x 10 ml) entre las etapas de desprotección y acoplamiento.

## 2. Síntesis del grupo de unión a albúmina

El éster mono-*terc*-butílico del ácido eicosanodioico puede prepararse como se conoce en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 2010102886 A1.

El éster mono-*terc*-butílico del ácido docosanodioico puede prepararse como se describe en lo siguiente:

Una solución 1 M del complejo de borano-tetrahidrofurano en tetrahidrofurano (94,1 ml, 94,1 mmol) se añadió por goteo a una solución de éster mono-*terc*-butílico del ácido icosanodioico (25,0 g, 62,7 mmol) en tetrahidrofurano seco (140 ml) a 0 °C en argón. La solución resultante se agitó a 0 °C durante 2 horas, después se eliminó el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadieron una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (300 ml) y agua (100 ml) y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (250 ml, 2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre silicagel (eluyente: diclorometano/metanol 99:1). Las fracciones con el producto puro se evaporaron y el residuo se pasó de nuevo por cromatografía (eluyente: diclorometano/metanol 99:1). Los productos se combinaron y se secaron *al vacío*, lo que produjo ácido 20-hidroxi-icosanoico éster *terc*-butílico como un sólido blanco.

Rendimiento: 16,50 g (68 %).

$^1\text{H}$  NMR espectro (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 3,64 (t, J=6,6 Hz, 2 H), 2,20 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,65-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,36-1,21 (m, 30 H).

El alcohol anteriormente preparado (16,5 g, 42,9 mmol) se disolvió en diclorometano seco (90 ml). Se añadió trietilamina (9,00 ml, 64,4 mmol), se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C y se añadió cloruro de mesilo (4,00 ml, 51,5 mmol) por goteo. Después de 1 hora la mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Se añadió agua (1,5 ml) y se agitó la mezcla 30 minutos. Los solventes se evaporaron, se añadió acetato de etilo (200 ml) y se extrajo la mezcla con ácido clorhídrico 1 M (2 x 100 ml), solución de carbonato de sodio al 5 % (2 x 100 ml) y agua (100 ml). Después del secado con sulfato de sodio anhidro, filtración y evaporación de solventes se obtuvo el éster *terc*-butílico del ácido 20-metanosulfonilo-icosanoico como un sólido blanco.

Rendimiento: 19,80 g (100 %).

$^1\text{H}$  NMR espectro (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 4,22 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 3,01 (s, 3 H); 2,20 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,81-1,68 (m, 2 H); 1,63-1,51 (m, 2 H); 1,44 (s, 9 H); 1,34-1,22 (m, 30 H).

El mesilato preparado anteriormente (17,8 g, 38,5 mmol) se disolvió en acetona (250 ml), se añadió bromuro de litio (6,69 g, 77,0 mmol) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante toda la noche. Después de enfriar, se evaporó el solvente, se añadió acetato de etilo (300 ml) y se extrajo la mezcla con solución de bicarbonato de sodio al 5 % (3 x 170 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron. El producto se secó *al vacío* para producir éster *terc*-butílico del ácido 20-bromo-icosanoico como un sólido blanco.

Rendimiento: 17,10 g (99 %).

$^1\text{H}$  NMR espectro (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 3,41 (t, J=6,9 Hz, 2 H); 2,20 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 1,90-1,77 (m, 2 H); 1,64-1,50 (m, 2 H); 1,43 (s, 9 H); 1,34-1,13 (m, 30 H).

Se disolvió hidruro de sodio (dispersión al 60 % en aceite mineral, 3,96 g, 99,0 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (100 ml) en nitrógeno. Se añadió dimetil malonato (22,6 ml, 198 mmol) y la mezcla de reacción se calentó brevemente a 100 °C, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió la solución anteriormente preparada de éster

terc-butílico del ácido 20-bromo-icosanoico (14,8 g, 33,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 4 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadió acetato de etilo (150 ml) y se lavó la solución orgánica con cloruro de amonio saturado acuoso (3 x 100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre silicagel (eluyente: hexano/acetato de etilo 96:4 a 93:7) que produce éster 22-terc-butílico éster 1-metilico del ácido 2-metoxicarbonil-docosanodioico como un sólido blanco.

Rendimiento: 16,10 g (97 %).

<sup>1</sup>H NMR espectro (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, delta<sub>H</sub>): 3,74 (s, 6 H); 3,36 (t, J=7,5 Hz, 1 H); 2,20 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,95-1,84 (m, 2 H); 1,64-1,51 (m, 2 H); 1,44 (s, 9 H); 1,34-1,21 (m, 32 H).

El éster 22-terc-butílico 1-éster metílico del ácido 2-metoxicarbonil-docosanodioico (16,1 g, 32,3 mmol) preparado anteriormente se disolvió en tetrahidrofurano (85 ml) y se añadió solución de hidróxido de litio monohidratado (4,07 g, 96,9 mmol) en agua (75 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, después se acidificó con ácido clorhídrico 1 M y se extrajo con acetato de etilo (4 x 150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron. El producto se secó *al vacío* para producir éster 22-terc-butílico del ácido 2-carboxi-docosanodioico como un sólido blanco.

Rendimiento: 14,50 g (95 %).

<sup>1</sup>H NMR espectro (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, delta<sub>H</sub>): 3,44 (t, J=7,4 Hz, 1 H); 2,22 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,00-1,89 (m, 2 H); 1,63-1,52 (m, 2 H); 1,45 (s, 9 H); 1,37-1,20 (m, 32 H).

Se disolvió éster 22-terc-butílico del ácido 2-carboxi-docosanodioico (14,5 g, 30,8 mmol) en tolueno (170 ml) y se sometió a reflujo a 110 °C durante 48 horas. Se evaporó el solvente, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre silicagel (eluyente: diclorometano/metanol 97:3) que produce el compuesto del título como un sólido blanco.

Rendimiento: 5,25 g (40 %).

Rendimiento total: 5,25 g (25 %)

<sup>1</sup>H NMR espectro (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, delta<sub>H</sub>): 2,35 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,21 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,68-1,53 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,35-1,22 (m, 32 H).

El éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico puede prepararse como se describe en lo siguiente:

Una suspensión de ácido nonadecanodioico (26,1 g, 79,5 mmol) en mezcla de tolueno (140 ml) y *t*-butanol (32 ml, 334,8 mmol, 4,4 eq.) se calentó a temperatura de reflujo (97 °C). La mezcla resultó en una solución de color amarillo claro. Se añadió DMAP (1,9 g, 15,2 mmol, 0,2 eq.), seguido por adición en goteo de Boc<sub>2</sub>O en tolueno (75 ml) durante 90 minutos. Se observó la evolución del CO<sub>2</sub> pesado. La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante toda la noche y se concentró a una suspensión blanca. Se añadió tolueno frío (200 ml) y los sólidos se retiraron por medio de filtración, se lavaron con tolueno y se secó al vacío (45 °C) (6,2 g, material de partida). El filtrado se concentró (45 °C) y se añadió heptano (350 ml) al residuo oleoso. La suspensión blanca se agitó durante 1 hora a 0 °C y los sólidos se aislaron por medio de filtración. El residuo similar a mantequilla en el filtro se disolvió en TBME y se enjuagó a través del filtro. El filtrado de heptano y el filtrado de TBME se concentraron separadamente. El residuo de heptano (10 g) contenía mayormente di-éster (aprox. 80 %) y el residuo de TBME (13,3 g) contenía mayormente mono-éster (aprox. 80 %). El residuo de TBME se purificó mediante cromatografía rápida (Sílice: 500 g, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/IPA 98:2 a 97:3). El compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (10,3 g, 33 %).

<sup>1</sup>H NMR espectro (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, delta<sub>H</sub>): 2,35 (t, J=7,6 Hz, 2 H); 2,20 (t, J=7,6 Hz, 2 H); 1,68-1,53 (m, 4 H); 1,43 (s, 9 H); 1,39-1,22 (m, 26 H).

3. Adhesión de las cadenas laterales a la cadena principal de péptido protegido unido a la resina

Cuando está presente una acilación en una cadena lateral de lisina, el grupo épsilon amino de la lisina a acilar se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta de adhesión de la porción de prolongación y el enlazador. La desprotección de Dde o ivDde se realizó con hidrazina al 2 % en 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/DCM (75:25, 5 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados como anteriormente. En algunos casos el grupo Mtt se eliminó mediante etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Liberty. La desprotección de Mtt se realizó con hexafluoroisopropanol o hexafluoroisopropanol/DCM (75:25) a temperatura ambiente durante 30 min seguido por el lavado con DCM (7 ml x 5), seguido por lavados con NMP (7ml x 5). La porción de prolongación y/o el enlazador pueden unirse al péptido ya

sea mediante acilación del péptido unido a resina o mediante acilación en solución del péptido no protegido. En el caso de la unión de la porción de prolongación y/o el enlazador a la resina peptidil protegida la unión puede ser modular mediante el uso de SPPS y bloques de construcción adecuadamente protegidos.

5 *Método:* SC\_P

El grupo de protección N-ε-lisina se eliminó como se describió anteriormente y la modificación química de la lisina se realizó mediante una o más etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Prelude mediante el uso de bloques de construcción protegidos adecuadamente como se describió anteriormente. Los acoplamientos dobles se realizaron como se describió en SPPS\_P con 3 horas por acoplamiento.

10 *Método:* SC\_L

El grupo de protección N-ε-lisina se eliminó como se describió anteriormente y la modificación química de la lisina se realizó mediante una o más etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Liberty mediante el uso de bloques de construcción protegidos adecuadamente como se describió anteriormente. Los acoplamientos dobles se realizaron como se describe en SPPS\_L.

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

20 *Método:* CP\_M1

Después de la síntesis la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5 o 92,5/5/2,5) seguido por precipitación con dietiléter. 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 µm, 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.

Si se desea, el contraíón del péptido puede cambiarse a sodio mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Como un ejemplo, se disolvieron aproximadamente 2 g de péptido en 250 ml de acetonitrilo/agua (50/50) y se cargaron en una columna C8, 5 µM, 50x250 mm de Waters X-Bridge en un sistema de RP-HPLC preparativa. Después de la carga, la columna se lavó con agua durante 8 min a una velocidad de flujo de 60 ml/min y con NaOH 0,01 N pH 11 a una velocidad de flujo de 60 ml/min durante 2 x 8 min. La sal de sodio del péptido se eluyó mediante el uso de un flujo de agua isocrático a 60 ml/min durante 10 min seguido por un gradiente lineal de acetonitrilo 5 % a 85 % durante 30 min.

35 *Método:* CP\_M2

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 dietiléter. 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 Kinetex C18, 5 µm, y se eluyó con una mezcla binaria de diamoniohidrogenofosfato 0,09 M en agua/acetonitrilo (90:10, pH 3,0) y acetonitrilo/2-propanol/agua (60:20:20). El péptido se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC estándar en una columna C18, 5 µm, 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.

Si se desea, el contraíón del péptido se puede cambiar a sodio mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica. Como un ejemplo, se disolvieron aproximadamente 2 g de péptido en 250 ml de acetonitrilo/agua (50/50) y se cargaron en una columna C8, 5 µM, 50x250 mm de Waters X-Bridge en un sistema de RP-HPLC preparativa. Después de la carga, la columna se lavó con agua durante 8 min a una velocidad de flujo de 60 ml/min y con NaOH 0,01 N pH 11 a una velocidad de flujo de 60 ml/min durante 2 x 8 min. La sal de sodio del péptido se eluyó mediante el uso de un flujo de agua isocrático a 60 ml/min durante 10 min seguido por un gradiente lineal de acetonitrilo 5 % a 85 % durante 30 min.

55 A2. Métodos Generales para la Detección y Caracterización

1. Métodos de LCMS

60 *Método:* LCMS01

LCMS01v1 se realizó en una configuración que consistió en el sistema Waters Acquity UPLC y el espectrómetro de masas LCT Premier XE de Micromass. Eluyentes: A: ácido fórmico 0,1 % en agua; B: ácido fórmico 0,1 % en acetonitrilo. El análisis se realizó a RT mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente 2-10 µl) en la columna que se eluyó con un gradiente de A y B. Las condiciones de UPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas fueron: Columna: Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm. Gradiente: Lineal 5 % - 95 % de acetonitrilo durante 4,0 min (alternativamente 8,0 min) a 0,4 ml/min. Detección: 214

nm (salida analógica del TUV (detector de UV ajustable)) Modo de ionización MS: API-ES. Escaneo: 100-2000 amu (alternativamente 500-2000 amu), etapa 0,1 amu.

## 2. Método de UPLC

5

*Método:* UPLC02

El análisis RP se llevó a cabo mediante el uso de un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones de UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7µm, 2,1 mm x 150 mm, 40°C. El sistema HPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían: A: 99,95% H<sub>2</sub>O, 0,05% TFA; B: 99,95% CH<sub>3</sub>CN, 0,05% TFA. 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.

10

## 3. Método MALDI-MS

15

*Método:* MALDI01v01

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.

20

## B. Preparación de compuestos de los ejemplos

### Ejemplo 1

25

N{Épsilon-27}-[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8, Glu22, Arg26, Lys27, Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

30

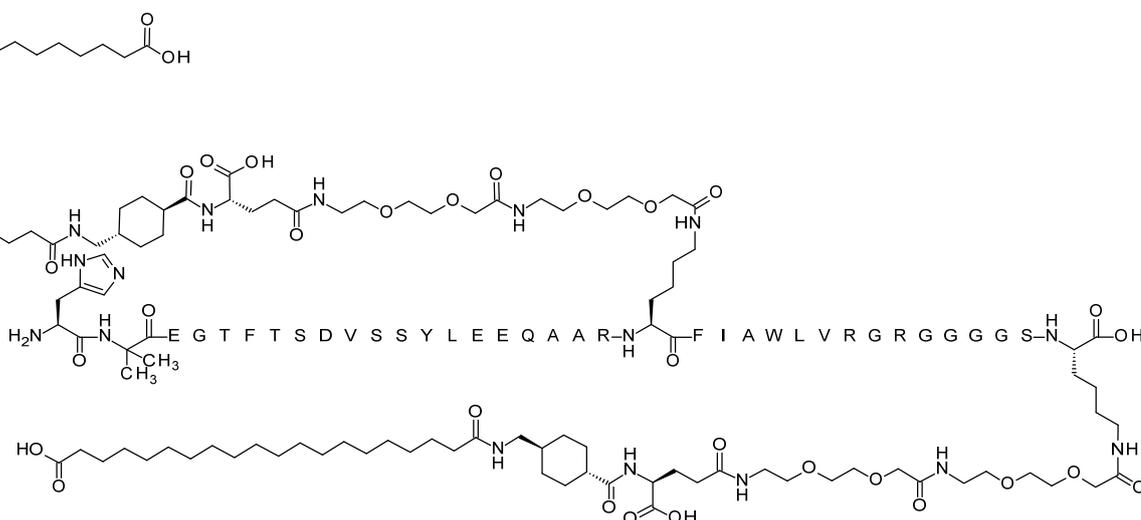
### Quím. 21:

35

40

45

50



55 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 2.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 10,6 min

60

MALDI01v01: calc. m/z = 5649; encontrado m/z = 5648

### Ejemplo 2

65 N{Épsilon-31}-[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]ethoxi]etoxi]acetil]

-[Aib8,Glu22,Arg26,Lys31,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)methyl]ciclohexanecarbonyl]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

5

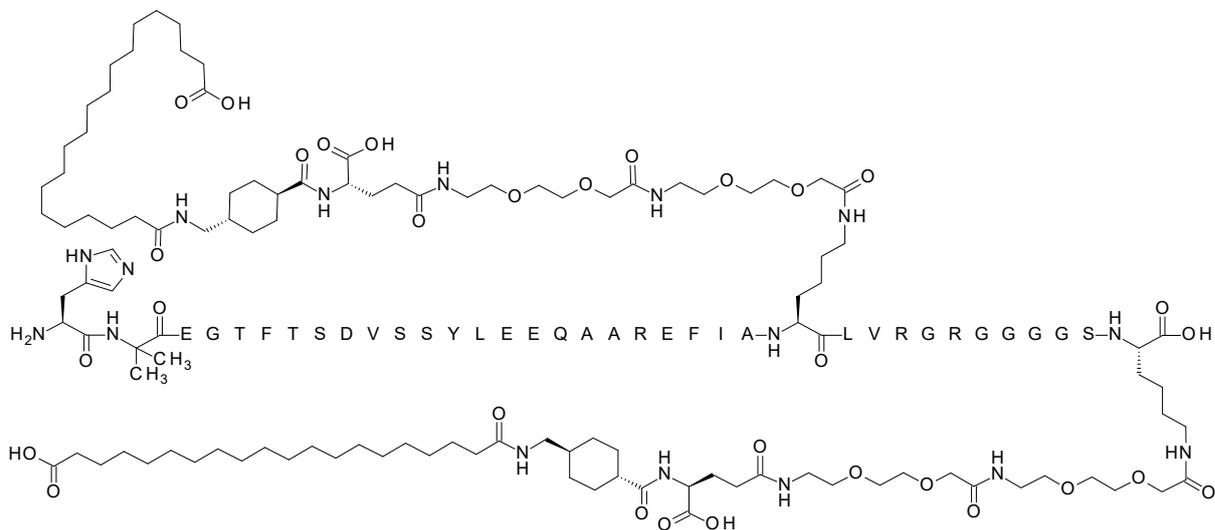
Quím. 22:

10

15

20

25



30

El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 3.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 10,6 min

35

MALDI01v01: calc. m/z = 5593; encontrado m/z = 5590

Ejemplo 3

40

N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonyl]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonyl]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

45

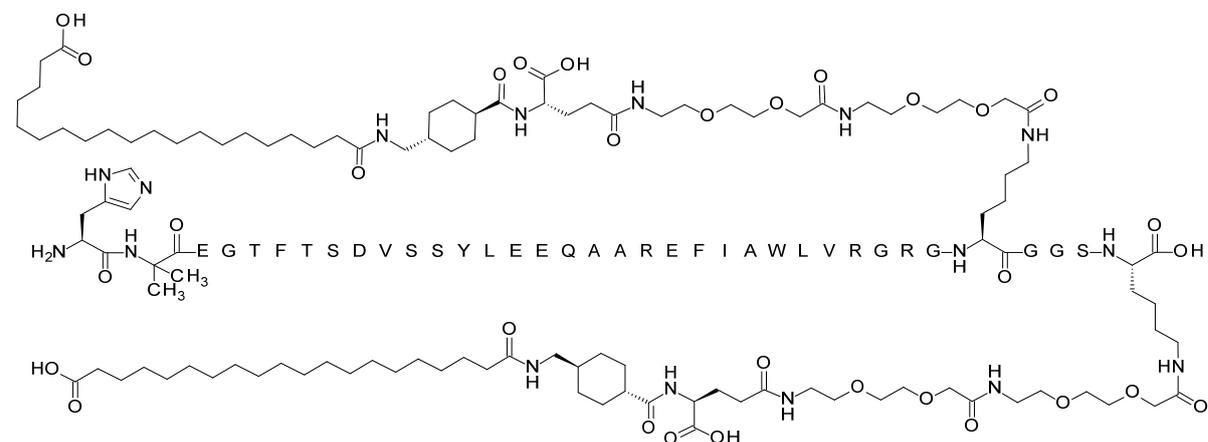
Quím. 23:

50

55

60

65



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

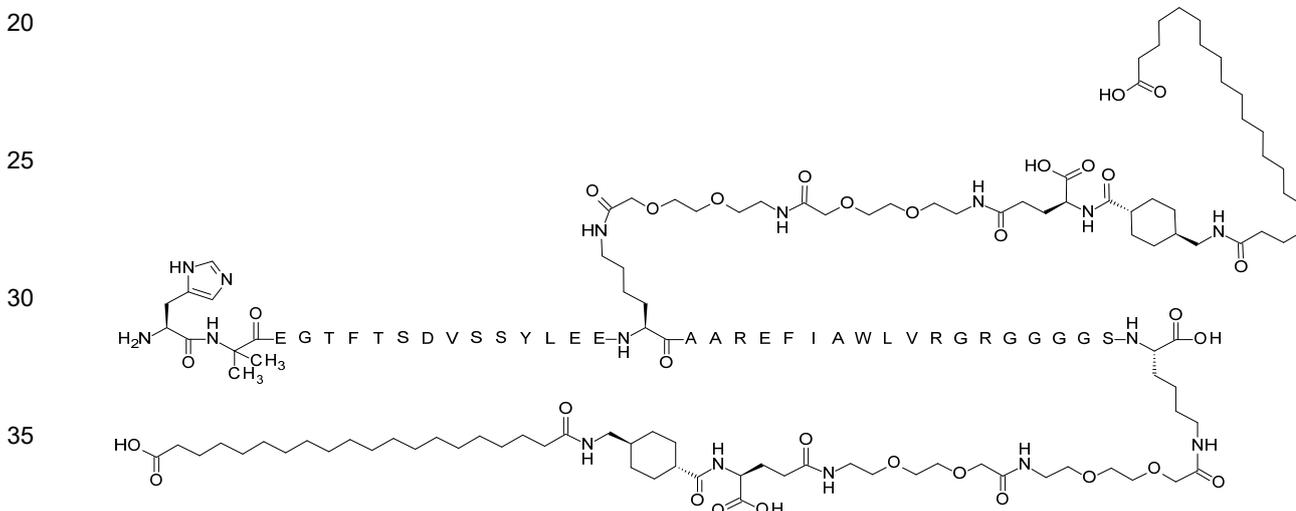
5 UPLC02: Rt =10,8 min

MALDI01v01: calc. m/z = 5722; encontrado m/z = 5720

Ejemplo 4

10 N{Épsilon-23}-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-  
 [Aib8,Glu22,Lys23,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-  
 15 [[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]L  
 ys

Quím. 24:



40 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 5.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

45 UPLC02: Rt =10,6 min

MALDI01v01: calc. m/z = 5651; encontrado m/z = 5649

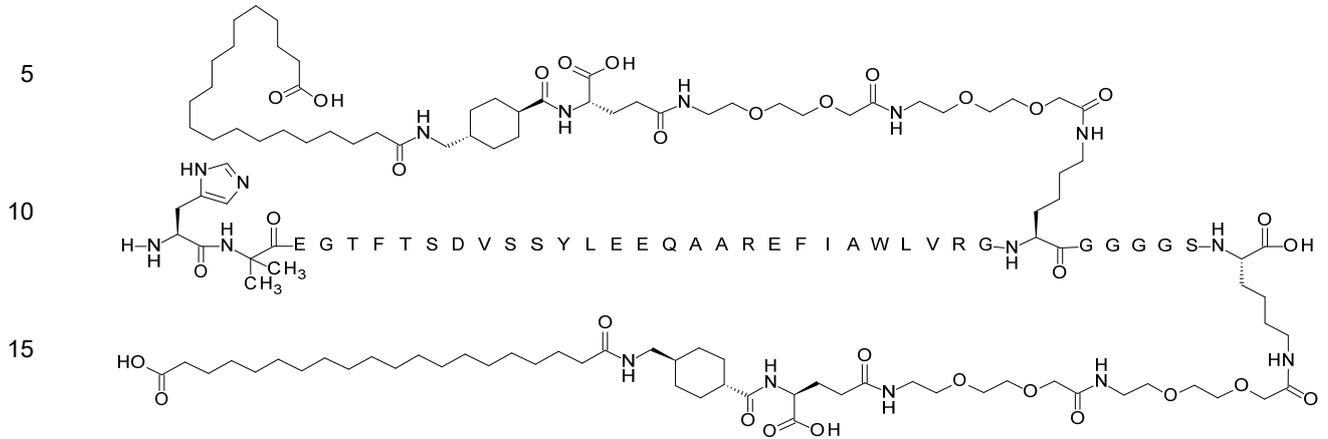
Ejemplo 5

50 N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-  
 [Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-  
 55 [[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]L  
 ys

60

65

Quím. 25:



20 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 6.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 11,3 min

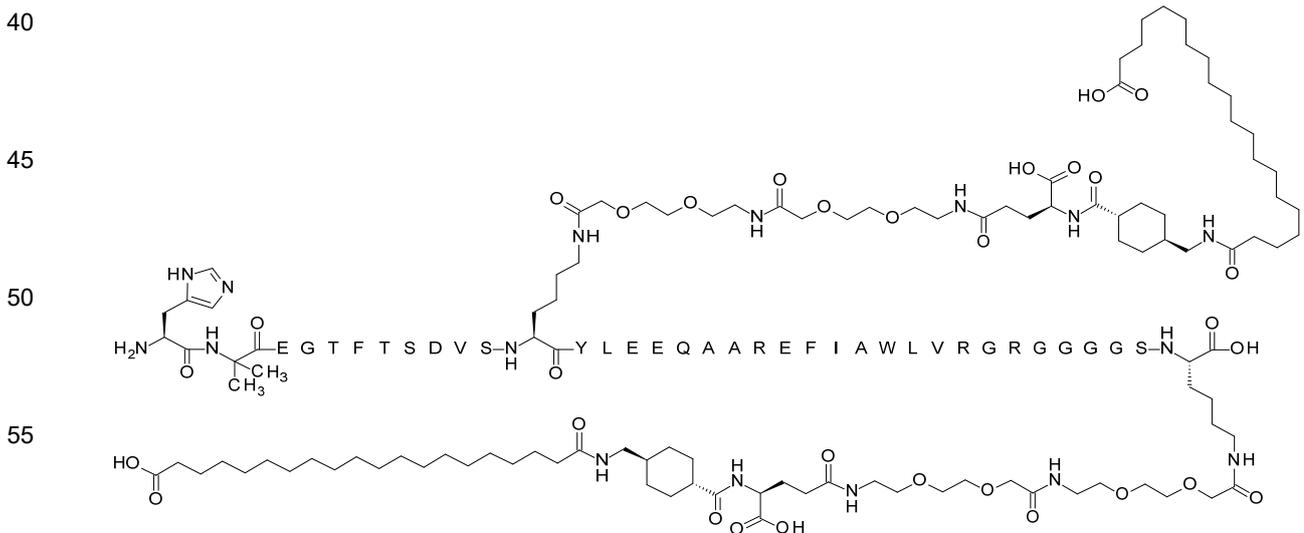
25

MALDI01v01: calc. m/z = 5623; encontrado m/z = 5621

Ejemplo 6

30 N{Épsilon-18}-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-  
 [Aib8,Lys18,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-  
 35 [[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]]L  
 ys

Quím. 26:



60 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 7.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

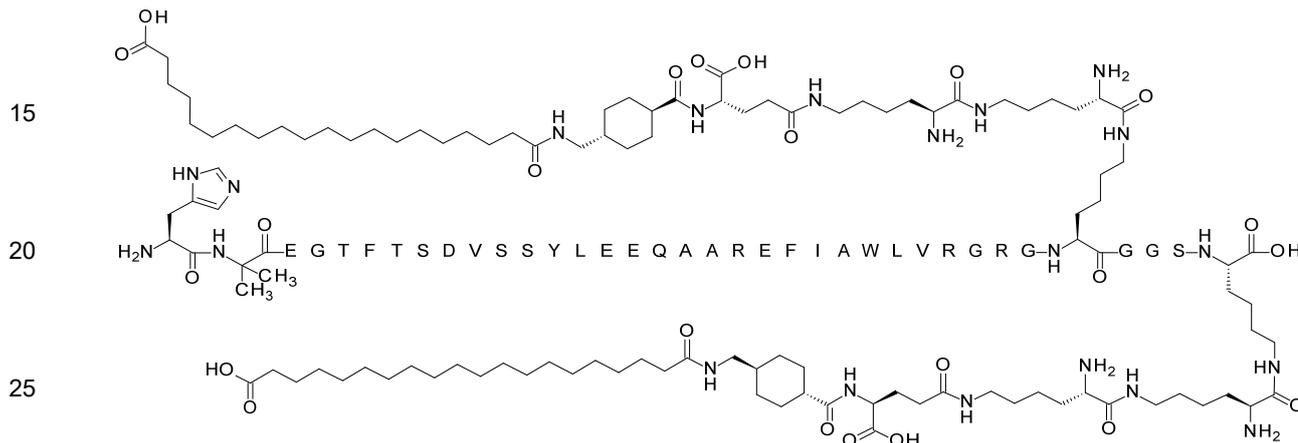
65 UPLC02: Rt = 10,8 min

LCMS01: Rt = 2,6 min, m/3 = 1898; m/4 = 1424; m/5 = 1139

Ejemplo 7

5 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}([(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}([(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys

10 Quím. 27:



30 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 9,8 min

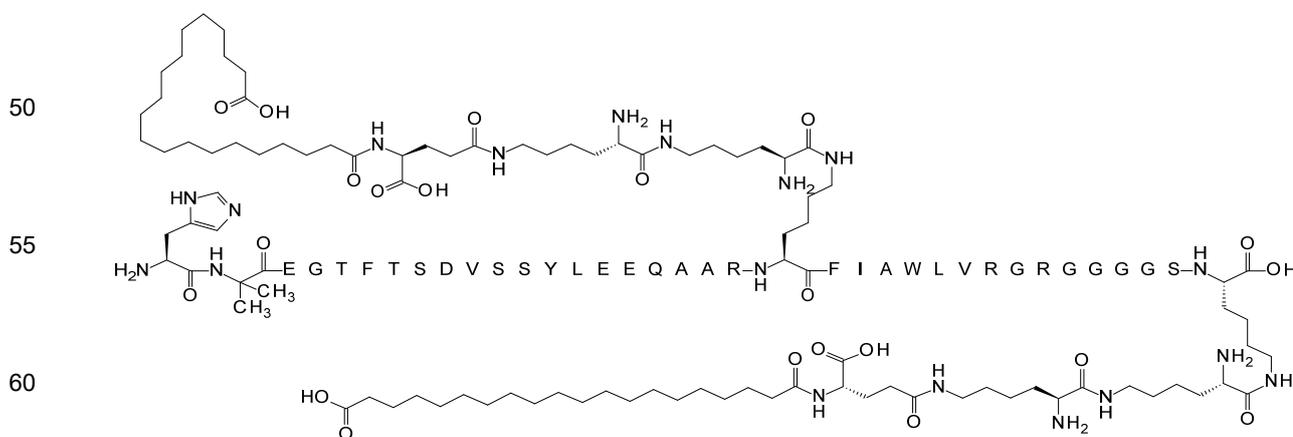
35

LCMS01: Rt = 2,3 min, m/3 = 1885; m/4 = 1415; m/5 = 1131; m/6 = 943

Ejemplo 8

40 N{Épsilon}27)-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Lys27,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}([(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys

45 Quím. 28:

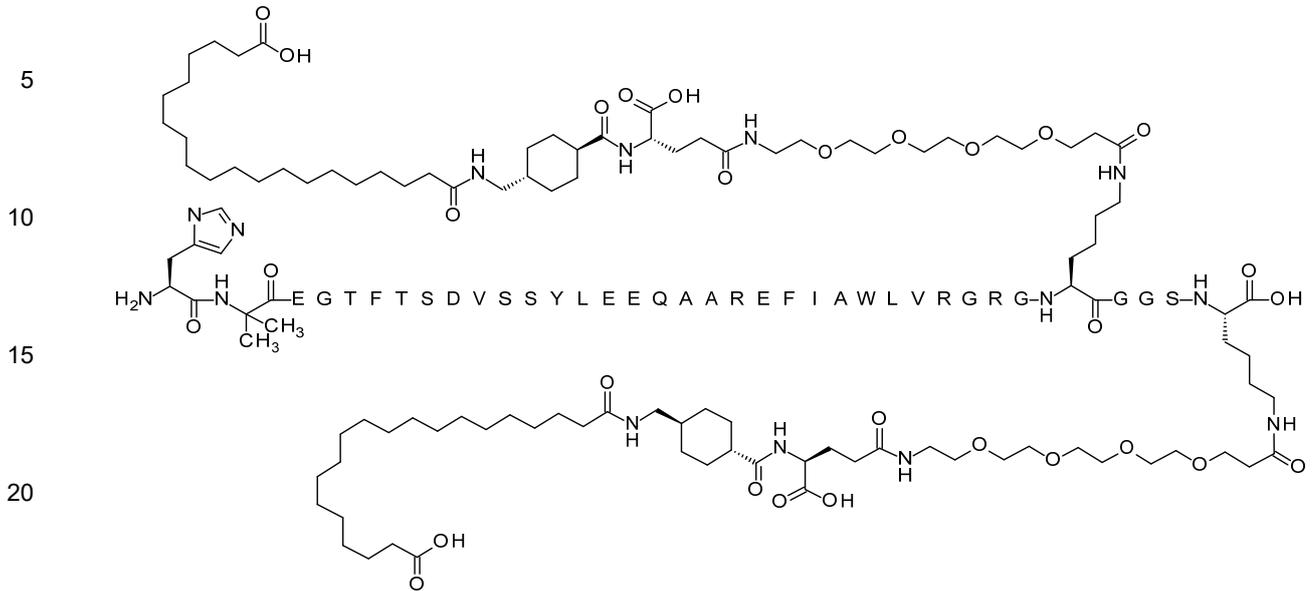


65 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 2.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1



Quím. 30:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M2

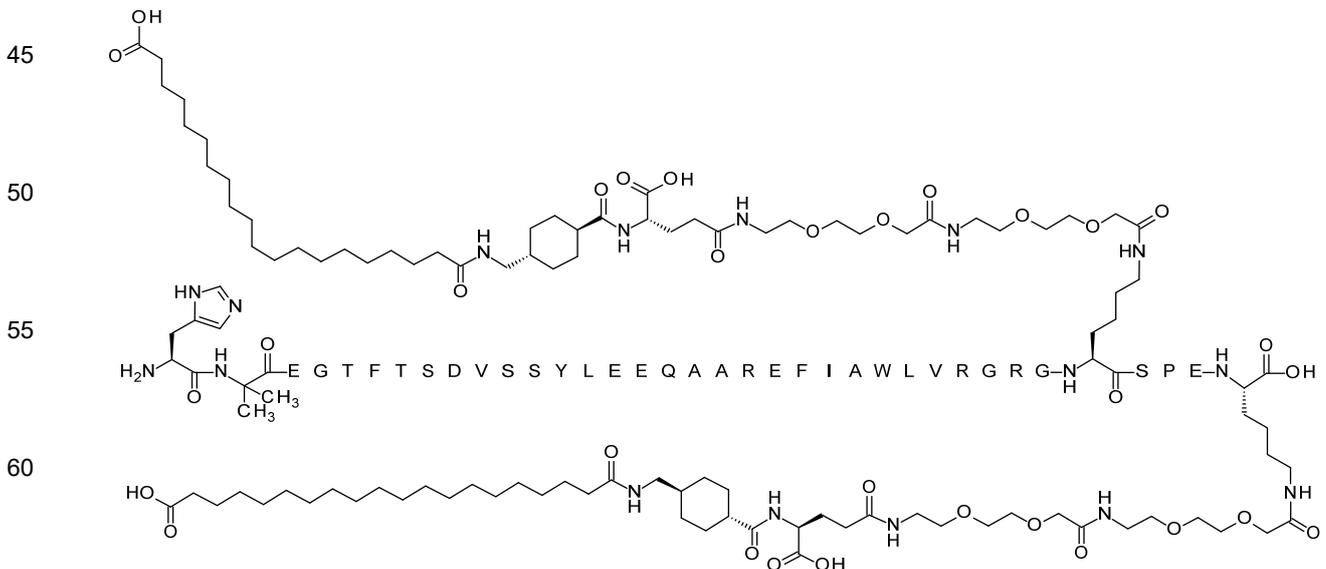
30 UPLC02: Rt = 11,2 min

LCMS01: Rt = 2,7; m/3 = 1880; m/4 = 1410; m/5 = 1128

Ejemplo 11

35 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 40 ys-Ser-Pro-Glu-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 ys

Quím. 31:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 14.

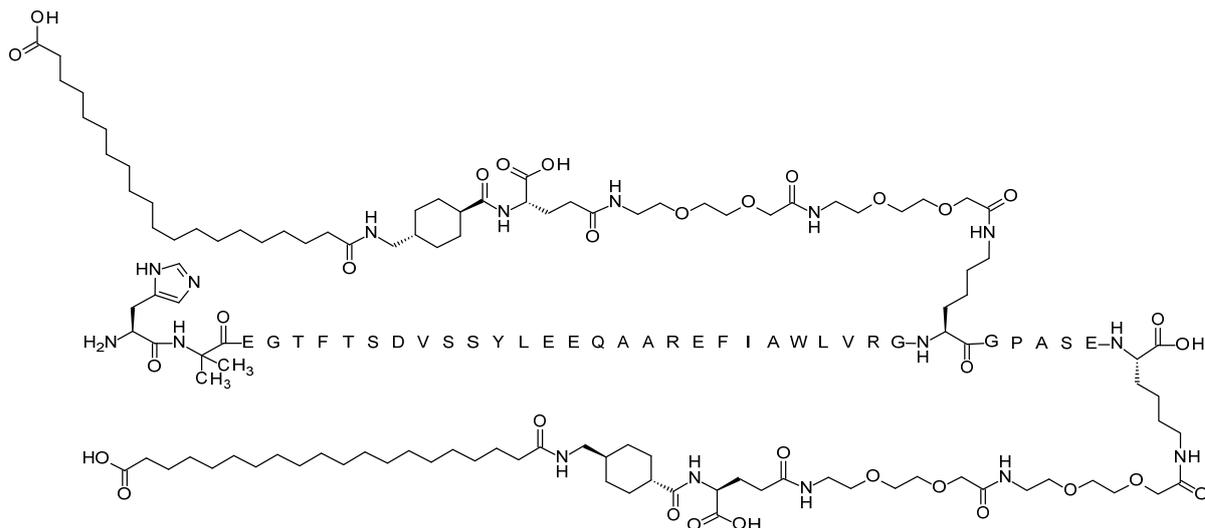




Ejemplo 15

N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Pro-Ala-Ser-Glu-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

Quím. 35:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 11.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

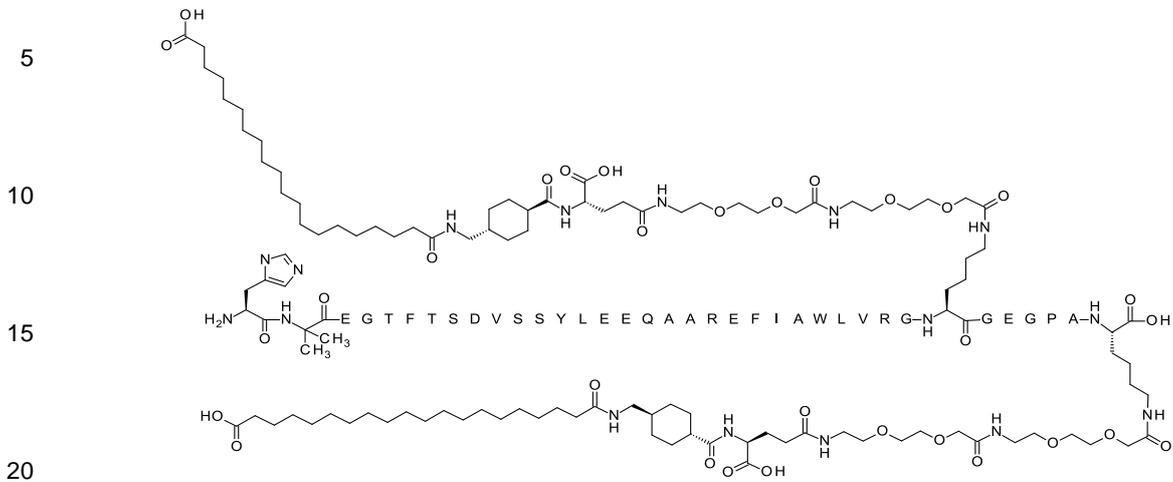
UPLC02: Rt = 12 min

LCMS01: Rt = 2,8 min; m/3 = 1917; m/4 = 1438; m/5 = 1151

Ejemplo 16

N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Arg34,Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu-Gly-Pro-Ala-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

Quím. 36:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 10.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 12 min

LCMS01: Rt = 2,8 min; m/3 = 1907; m/4 = 1431; m/5 = 1145

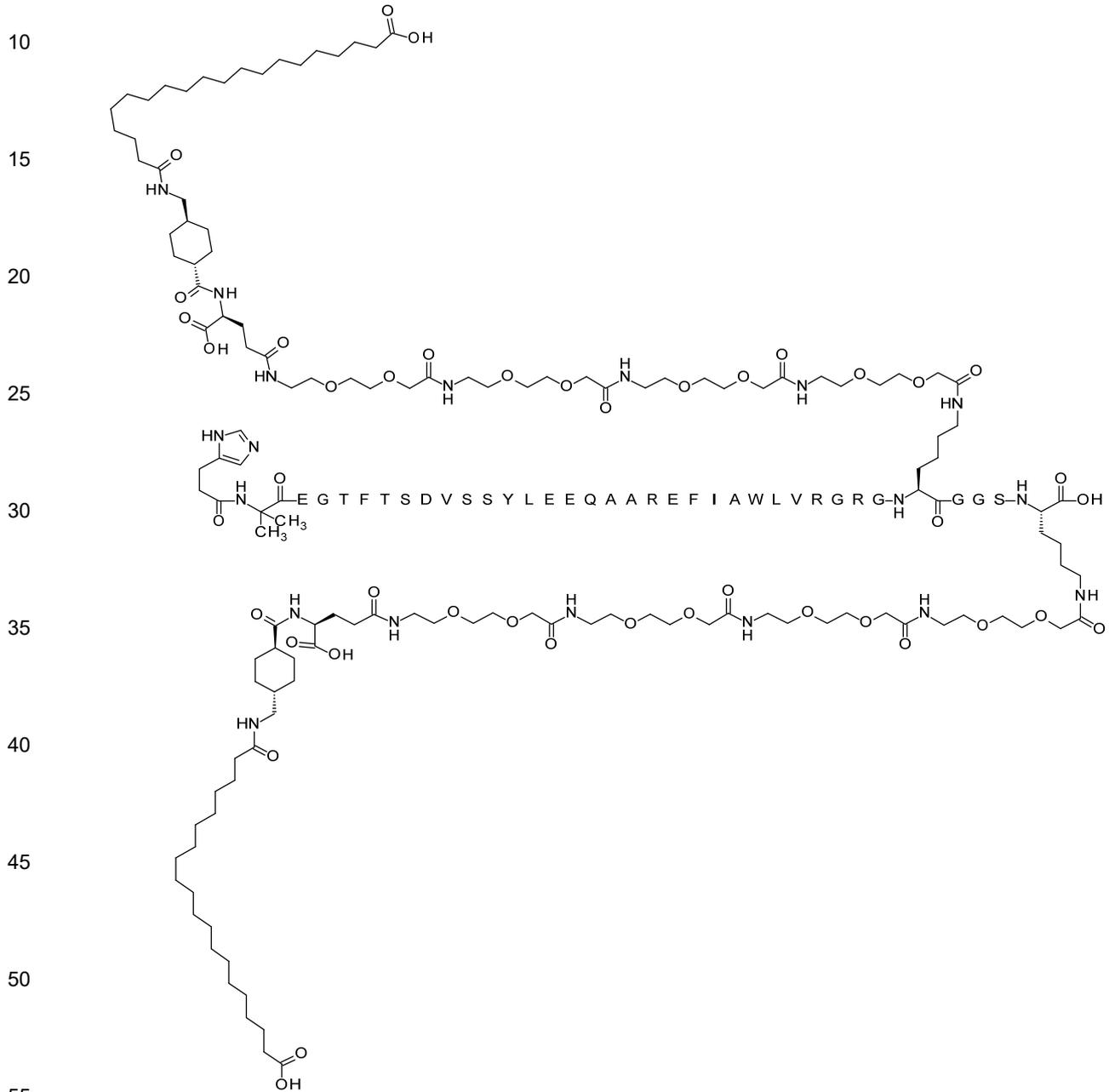
Ejemplo 17

N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]a  
 mino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-  
 5 carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]a  
 mino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

Quím. 38:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 8.  
 Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 11,5 min

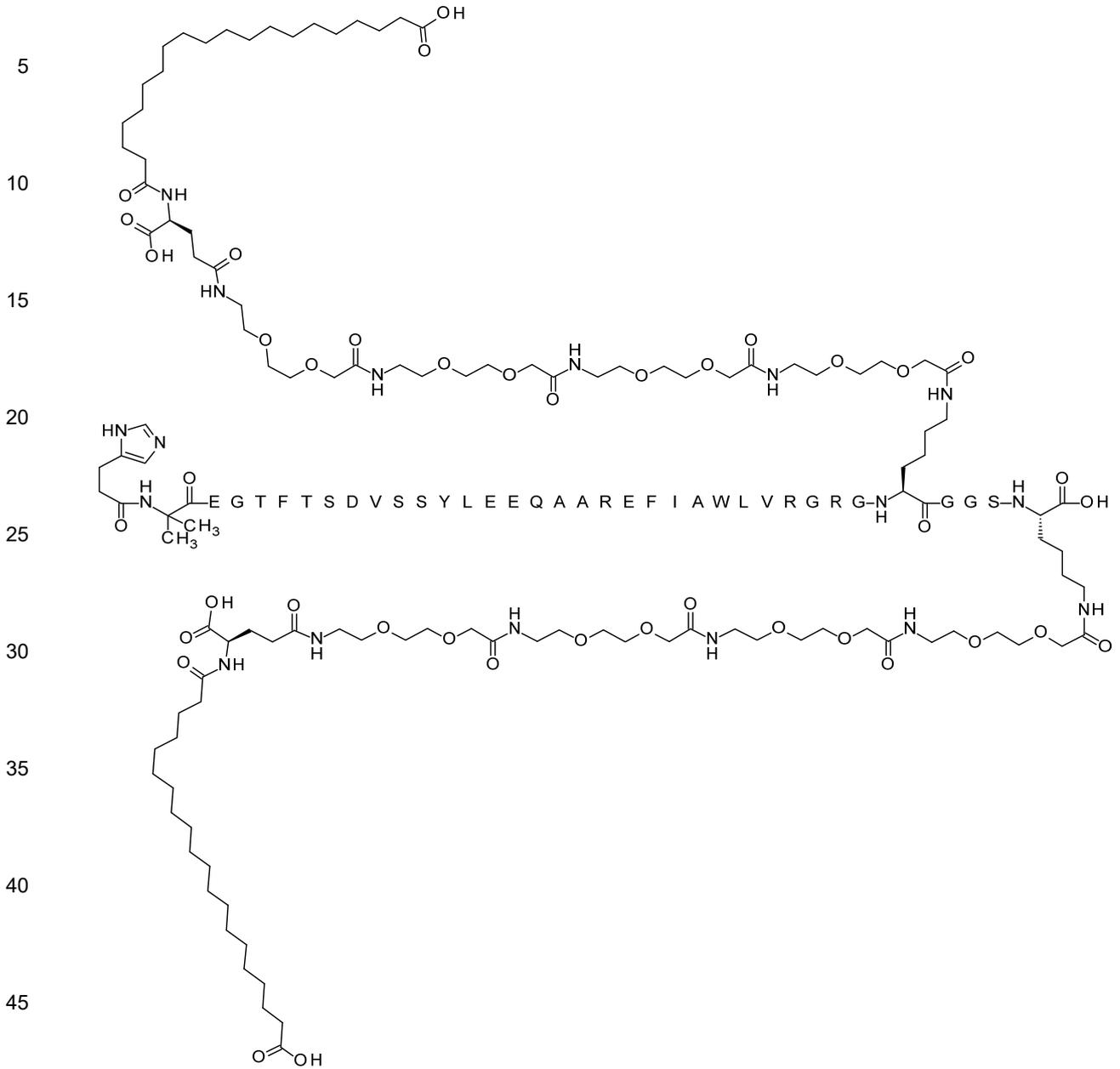
LCMS01: Rt = 2,7 min; m/4 = 1572; m/5 = 1258

Ejemplo 19

N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-  
 4-(19-



Quím. 40:



50 El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 8.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 10,9 min

55

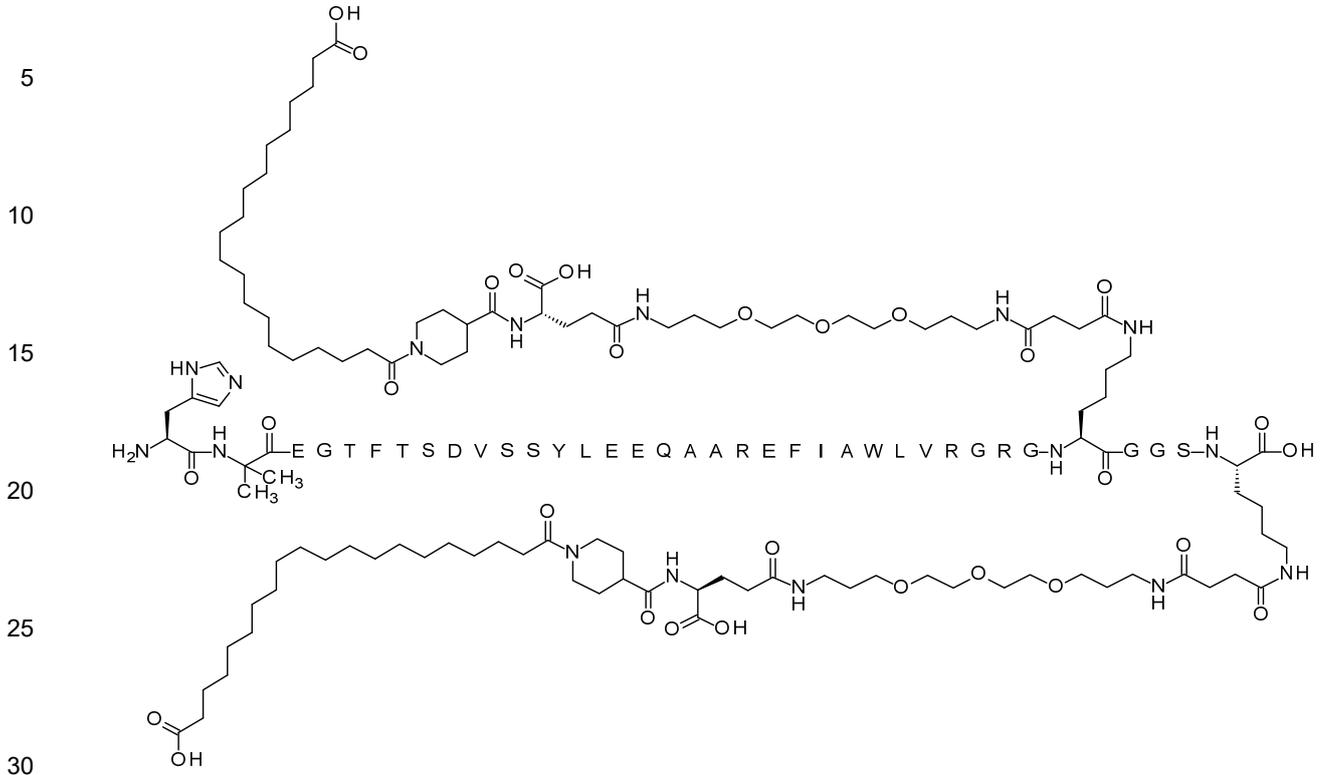
LCMS01: Rt = 2,6 min; m/4 = 1503; m/5 = 1203

Ejemplo 21

60 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[4-[3-[2-[2-[3-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[1-(19-carboxinadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-4-oxobutanoil]]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[4-[3-[2-[2-[3-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[1-(19-carboxinadecanoil)piperidina-4-carbonil]amino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-4-oxobutanoil]]Lys

65

Quím. 41:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

UPLC02: Rt = 11,1 min

LCMS01: Rt = 2,7 min; m/3 = 1897; m/4 = 1423; m/5 = 1139

Ejemplo 22

N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[3-[2-[2-[3-[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-2-oxoetoxi]acetil][Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[3-[2-[2-[3-[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-2-oxoetoxi]acetil]Lys

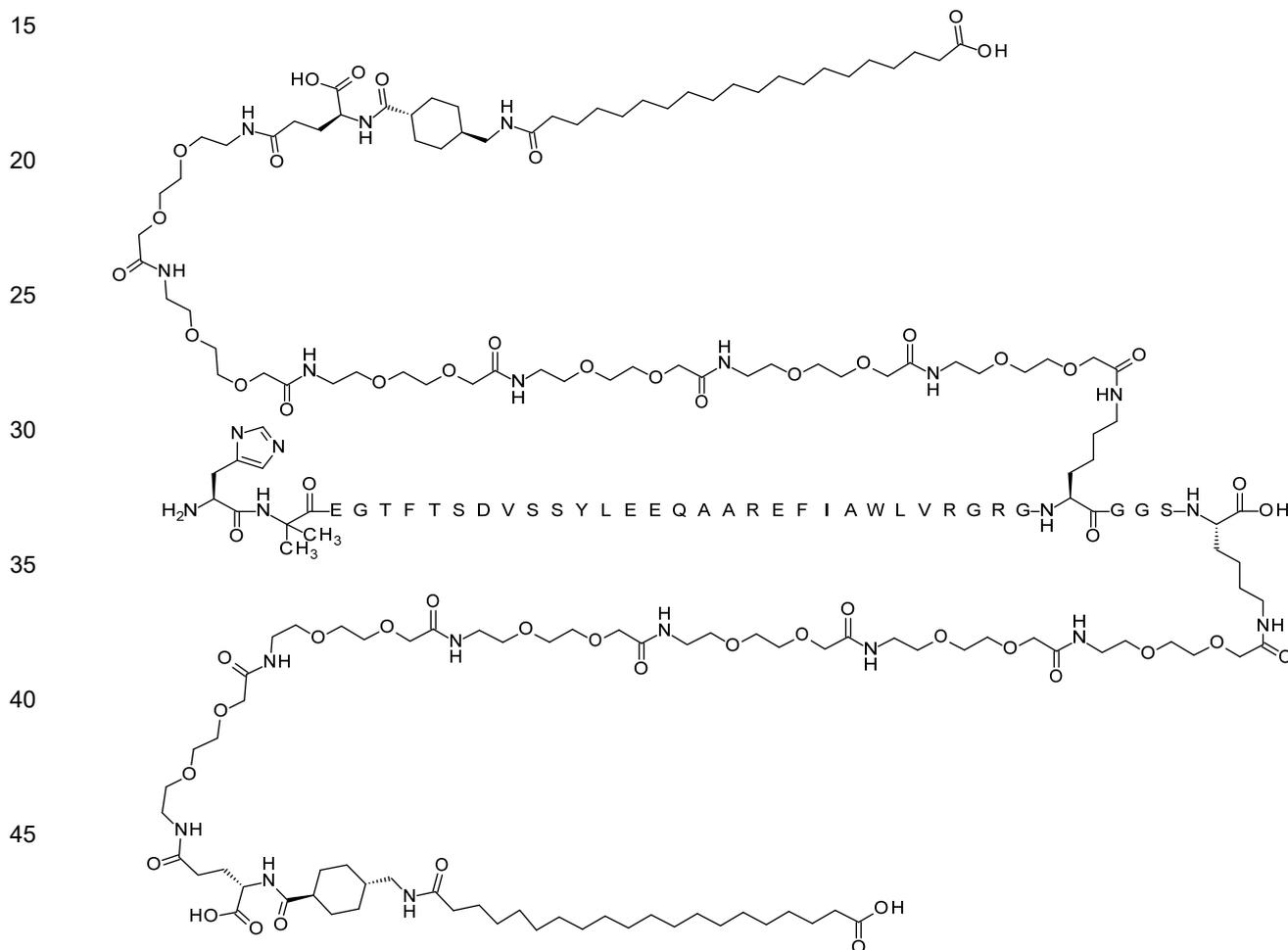


LCMS01: Rt = 2,7 min; m/4 = 1401,3; m/5 = 1121

Ejemplo 24

5 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-  
 10 carboxinadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]a  
 mino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-  
 N{Épsilon}[2-  
 carboxinadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]a  
 mino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

Quím. 44:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

55 UPLC02: Rt = 10,7 min

LCMS01: Rt = 2,6 min; m/4 = 1721; m/5 = 1377

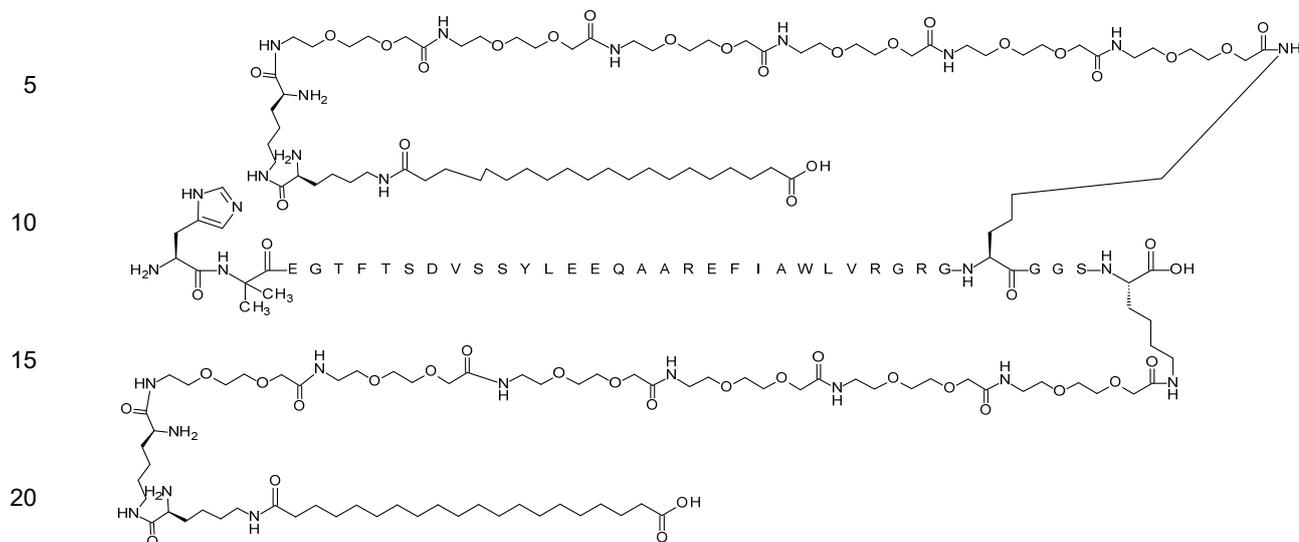
Ejemplo 25

60 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-  
 65 carboxinadecanoilamino)hexanoil]amino]hexanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-  
 amino-6-((2S)-2-amino-6-(19-  
 carboxinadecanoilamino)hexanoil]amino]hexanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-  
 amino-6-((2S)-2-  
 amino-6-(19-





Quím. 48:



El péptido tiene la sec. con núm. de ident.: 4.

25 Método de síntesis: SPPS\_P; SC\_L; CP\_M2

UPLC02: Rt = 8,6 min

LCMS01: Rt = 2,2 min; m/4 = 1716; m/5 = 1373

30 Métodos farmacológicos

Ejemplo 29: Potencia in vitro

35 El propósito de este ejemplo es probar la actividad, o potencia, de los derivados de GLP-1 in vitro. La potencia in vitro es la medida de la activación del receptor de GLP-1 humano en un ensayo de células completas.

Las potencias de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-28 se determinaron como se describe más adelante. Se incluyó la semaglutida para la comparación.

40 Principio

La potencia in vitro se determinó mediante la medición de la respuesta del receptor de GLP-1 humano en un ensayo de gen reportero. El ensayo se realizó en la línea celular BHK transfectada establemente, que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta de cAMP (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). Cuando se activa el receptor de GLP-1 humano da como resultado la producción de cAMP, que a su vez da como resultado que se expresa la proteína de la luciferasa. Cuando se completa la incubación del ensayo, se añade el sustrato de la luciferasa (luciferina) y la enzima convierte la luciferina en oxiluciferina para producir bioluminiscencia. La luminiscencia se mide como la lectura del ensayo.

50 Cultivo celular y preparación

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

Las células se cultivaron en CO<sub>2</sub> al 5 % en medio de cultivo celular. Se alicuotaron y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes de cada ensayo se tomó una alícuota y se lavó dos veces en PBS antes de suspenderla a la concentración deseada en el tampón específico del ensayo. Para las placas de 96 pocillos se produjo la suspensión con una concentración final de 5x10<sup>3</sup> células/pocillo.

Materiales

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

Tampones

5 El medio de cultivo celular consistió en medio DMEM con FBS al 10 % (suero fetal bovino; Invitrogen 16140-071), G418 1 mg/ml (Invitrogen 15140-122), MTX 240 nM (metotrexato; Sigma M9929) y pen/strep al 1 % (penicilina/estreptomicina; Invitrogen 15140-122).

10 El medio del ensayo consistió en DMEM w/o fenol rojo, Hepes 10 mM y Glutamax 1x. El tampón del ensayo consistió en ovalbúmina al 2 % y Pluronic F-68 al 0,2 % en el medio del ensayo.

Procedimiento

- 1) Las reservas de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C.
- 15 2) Las células se lavaron tres veces en PBS.
- 3) Las células se contaron y se ajustaron a  $5 \times 10^3$  células/50  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  células/ml) en el medio del ensayo. A cada pocillo en la placa de ensayo se transfirió una alícuota de 50  $\mu$ l de células.
- 20 4) Las reservas de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia se diluyeron hasta una concentración de 0,2  $\mu$ M en el tampón del ensayo. Los compuestos se diluyeron 10-veces para producir las siguientes concentraciones:  $2 \times 10^{-7}$  M,  $2 \times 10^{-8}$  M;  $2 \times 10^{-9}$  M,  $2 \times 10^{-10}$  M,  $2 \times 10^{-11}$  M,  $2 \times 10^{-12}$  M,  $2 \times 10^{-13}$  M, and  $2 \times 10^{-14}$  M.
- 25 5) Se transfirió una alícuota de 50  $\mu$ l del compuesto o del blanco desde la placa de dilución hacia la placa del ensayo. Los compuestos se analizaron a las siguientes concentraciones finales:  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M;  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M,  $1 \times 10^{-13}$  M, and  $1 \times 10^{-14}$  M.
- 6) La placa de ensayo se incubó durante 3 horas en CO<sub>2</sub> al 5 % en una incubadora a 37 °C.
- 30 7) La placa de ensayo se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min.
- 8) A cada pocillo de la placa de ensayo se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l del reactivo steadylite plus (el reactivo es sensible a la luz).
- 35 9) Cada placa de ensayo se cubrió con papel de aluminio para protegerla de la luz y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente.
- 10) Cada placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Packard.

40 Cálculos y Resultados

Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático realiza una regresión no lineal (log(agonista) vs respuesta). Los valores de EC<sub>50</sub> que se calcularon mediante el programa informático y se informaron en pM se muestran en la Tabla 1 más adelante.

45 Para cada muestra se midió un mínimo de dos réplicas. Los valores que se informan son promedios de las réplicas.

50

55

60

65

Tabla 1: Potencia in vitro

	Compuesto del ejemplo núm.	EC <sub>50</sub> (pM)
5	1	55
	2	36
	3	43
	4	74
	5	61
	6	93
10	7	381
	8	260
	9	101
	10	27
	11	27
15	12	24
	13	24
	14	22
	15	20
20	16	25
	17	12
	18	13
	19	6,2
	20	8,4
25	21	19
	22	10
	23	22
	24	7,0
	25	10
30	26	13
	27	4,4
	28	3,4
	semaglutida	8,3

35 Todos los compuestos tienen datos de potencia que confirman que son agonistas del receptor de GLP-1.

#### Ejemplo 30: Unión al receptor de GLP-1

40 El propósito de este ejemplo es probar la unión a los receptores de los derivados de GLP-1 in vitro. La unión al receptor es una medida de la afinidad de un derivado por el receptor de GLP-1 humano.

#### Principio

45 La unión al receptor de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-28 al receptor de GLP-1 humano se midió en un ensayo de unión competitiva. En este tipo de ensayo, un ligando marcado (en este caso <sup>125</sup>I-GLP-1) se une al receptor. Cada derivado se añade en una serie de concentraciones a las membranas aisladas que contienen el receptor de GLP-1 humano y se monitorea el desplazamiento del ligando marcado. La unión al receptor se informa como la concentración a la cual la mitad del ligando marcado se desplaza del receptor, el valor de IC<sub>50</sub>. Se incluyó semaglutida como compuesto comparativo. Para probar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se realiza con una baja concentración de albúmina sérica (máx. 0,001 % como concentración final del ensayo así como también en presencia de una concentración considerablemente mayor de albúmina sérica (2,0 % como concentración final del ensayo). Un aumento del valor del IC<sub>50</sub> en presencia de albúmina sérica indica una afinidad a la albúmina sérica y representa un método para predecir un perfil farmacocinético prolongado de la sustancia de prueba en modelos animales.

#### 55 Materiales

Se usaron los siguientes compuestos químicos en el ensayo: Albúmina sérica humana (HSA) (Sigma A1653), DMEM w/o fenol rojo (Gibco 11880-028), Pen/strep (Invitrogen 15140-122), G418 (Invitrogen 10131-027), HEPES 1 M (Gibco 15630), EDTA (Invitrogen 15575-038), PBS (Invitrogen 14190-094), suero fetal bovino (Invitrogen 16140-071), EGTA, MgCl<sub>2</sub> (Merck 1.05832.1000), Tween 20 (Amresco 0850C335), partículas de SPA (aglutinina de germen de trigo (WGA) perlas de SPA, Perkin Elmer RPNQ0001), [<sup>125</sup>I]-GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub> (obtenido en el laboratorio), OptiPlate™-96 (Packard 6005290).

65 El tampón 1 consistió en Na-HEPES 20 mM más EDTA 10 mM y el pH se ajustó a 7,4. El tampón 2 consistió en Na-HEPES 20 mM más EDTA 0,1 mM y el pH se ajustó a 7,4. El tampón del ensayo consistió en HEPES 50 mM

suplementado con EGTA 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween 20 al 0,005 % y el pH se ajustó a 7,4. La reserva de albúmina al 8 % consistió en HSA disuelto al 8 % (p/v) en el tampón del ensayo. La reserva de albúmina al 0,02 % consistió en HSA disuelto al 0,02 % (p/v) en el tampón del ensayo.

5 Cultivo celular y preparación de membranas

Las células que se usaron en este ensayo (clon FCW467-12A) eran células BHK con BHKTS13 como línea celular parental. Las células expresan el receptor de GLP-1 humano.

10 Las células se cultivaron en CO<sub>2</sub> al 5 % en DMEM, FCS al 10 %, Pen/Strep al 1 % (penicilina/estreptomicina) y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418.

15 Para obtener una preparación de membranas las células se cultivaron hasta aproximadamente 80 % de confluencia. Las células se lavaron dos veces en solución salina de tampón fosfato y se cosecharon. Las células se sedimentaron mediante el uso de una centrifugación breve y el sedimento se mantuvo en hielo. El sedimento de células se homogenizó con el instrumento de dispersión ULTRA-THURRAX™ durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada del tampón 1 (por ejemplo, 10 ml). El homogenato se centrifugó durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió (homogenizado) en 10 ml del tampón 2 y se 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 alicuotaron y se almacenaron a menos 80°C.

Procedimiento

25 1. Para el ensayo de unión al receptor en presencia de baja HSA (0,005 %) se añadieron 50 µl del tampón del ensayo a cada pocillo de una placa de ensayo. El ensayo continuó con la etapa 3.

2. Para el ensayo de unión al receptor en presencia de alta HSA (2 %) se añadieron 50 µl de la reserva de albúmina al 8 % a cada pocillo de una placa de ensayo. El ensayo continuó con la etapa 3.

30 3. Los compuestos de prueba se diluyeron en serie para producir las siguientes concentraciones: 8x10<sup>-7</sup> M, 8x10<sup>-8</sup> M, 8x10<sup>-9</sup> M, 8x10<sup>-10</sup> M, 8x10<sup>-11</sup> M, 8x10<sup>-12</sup> M y 8x10<sup>-13</sup> M. Se añadieron veinticinco µl a los pocillos adecuados en la placa de ensayo.

35 4. Las alícuotas de membranas celulares se descongelaron y se diluyeron hasta sus concentraciones de trabajo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.

40 5. Las perlas de WGA SPA se suspendieron en el tampón del ensayo a 20 mg/ml. La suspensión se diluyó hasta 10 mg/ml en el tampón del ensayo justo antes de añadirla a la placa de ensayo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.

6. La incubación se inició mediante la adición de 25 µl de solución de [<sup>125</sup>I]-GLP-1]-(7-36)NH<sub>2</sub> 480 pM a cada pocillo de la placa de ensayo. Se reservó una alícuota de 25 µl para medir los conteos totales/pocillo.

45 7. La placa de ensayo se incubó durante 2 horas a 30 °C.

8. La placa de ensayo se centrifugó durante 10 min.

9. La placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Packard.

50 Cálculos

Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático promedió los valores de las réplicas y realizó una regresión no lineal. Los valores de IC<sub>50</sub> se calcularon mediante el programa informático y se informaron en nM.

55 Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados:

60

65

Tabla 2: Unión al receptor de GLP-1

	Compuesto del ejemplo núm.	IC <sub>50</sub> en baja HSA (nM)	IC <sub>50</sub> en alta HSA (nM)
	1	0,75	275
5	2	1,4	≥1000
	3	1,2	185
	4	0,85	113
	5	1,1	101
	6	1,0	≥1000
10	7	2,2	197
	8	0,43	383
	9	1,6	21
	10	1,3	123
	11	1,5	116
15	12	1,4	212
	13	1,4	160
	14	1,5	530
	15	1,6	928
20	16	1,4	602
	17	1,8	99
	18	2,3	219
	19	2,4	142
	20	4,1	270
25			
	21	1,3	177
	22	0,82	194
	23	1,4	201
30	24	0,67	84
	25	0,22	38
	26	0,88	202
	27	0,08	30
	28	0,05	30
35	semaglutida	0,56	324

Todos los compuestos mostraron muy buena unión al receptor de GLP-1 en ausencia de albúmina, y la mayoría de los compuestos también mostraron muy buena unión en presencia de albúmina. Los dos compuestos que tuvieron valores ≥1000 de IC<sub>50</sub> excedieron el límite de detección del ensayo.

#### Ejemplo 31: Estudio farmacocinético en minicerdos

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 en el cuerpo y de esta manera su tiempo de acción. Esto se hizo en un estudio farmacocinético (PK), donde se determinó la vida media terminal del derivado en cuestión. Por tiempo de vida media terminal se entiende el tiempo que se tarda en reducir a la mitad una determinada concentración plasmática en la fase de eliminación terminal.

Los derivados de los Ejemplos 1-5 se dosificaron con 2 nmol/kg, el derivado del Ejemplo 6 se dosificó con 5 nmol/kg, y los derivados de los Ejemplos 7-9 se dosificaron con 15 nmol/kg. Se incluyó semaglutida para la comparación (1,5 nmol/kg).

En los estudios se usaron minicerdos Göttingen machos 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 (cerdos con catéteres permanentes) o en un grupo 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 caudal o craneal 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.

Los derivados de GLP-1 se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 70-145 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 hasta una concentración generalmente de 20-60 nmol/ml.

Se administraron inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a, por ejemplo, 0,050-0,125 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter o a través del venflon, y se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos hasta 25 días después de la dosificación (preferentemente a través del otro catéter o por venipuntura). Las muestras de sangre (por ejemplo, 0,8 ml) se colectaron en tampón de EDTA (8 mM) y luego 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 realizara el análisis de la concentración plasmática de los respectivos compuestos de GLP-1 mediante el uso de LOCI. Los perfiles individuales de concentración plasmática contra tiempo se analizaron mediante un método farmacocinético no-compartimental en Phoenix v. 6.2 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos), u otro programa informático relevante para el análisis PK, y se determinaron los tiempos de vida media terminales resultantes (media armónica).

#### Resultados

Tabla 3: Estudio farmacocinético en minicerdos (i.v.)

Compuesto del ejemplo núm.	Tiempo de vida media terminal (h)
1	121
2	110
3	147
4	137
5	131
6	99
7	106
8	137
9	167
semaglutida	55

Los derivados de la invención que se analizaron tienen tiempos de vida media terminales muy largos (al menos dos veces el de semaglutida).

#### Ejemplo 32: Estudio farmacodinámico en ratones db/db

El propósito del estudio es verificar el efecto agudo 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 de los Ejemplos 1-8 y 10 se probaron en un estudio de dosis única en un modelo de ratón obeso y diabético (ratones db/db) como se describe a continuación. Los derivados se probaron a una dosis de 10 nmol/kg (Ejemplo 10), o 30 nmol/kg (Ejemplos 1-8).

Seis ratones db/db (de Taconic, Dinamarca) de aproximadamente 10 semanas de edad se enrolaron en el estudio por cada compuesto a probar, se alimentaron desde el nacimiento con la dieta NIH31 (NIH 31M Rodent Diet, comercializada por Taconic Farms, Inc., Estados Unidos, ver [www.taconic.com](http://www.taconic.com)). Los ratones tuvieron libre acceso al alimento estándar (por ejemplo Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Dinamarca) y al agua corriente y se mantuvieron a 24 °C. Después de 1-2 semanas de adaptación, se evaluó el nivel basal de glucosa en sangre dos veces en dos días consecutivos (es decir a las 9 am). Los ratones se asignaron a los grupos de tratamiento sobre la base de la correspondencia entre los niveles de glucosa en sangre y los pesos corporales. Los ratones se usaron en experimentos con una duración de 120 horas, y se reutilizaron hasta 2 veces. Después del último experimento, los ratones se sacrificaron.

Los animales se agruparon para recibir tratamiento de la siguiente manera: Vehículo, s.c., o derivado de GLP-1, s.c., donde el vehículo fue fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 70 mM, polisorbato 80 al 0,05 %, pH 7,4 (Ejemplos 1, 2, 7 y 10); o fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, Tween 80 al 0,05 % (p/v), pH 7,4 (Ejemplos 3-6 y 8).

El derivado de GLP-1 se disolvió en el vehículo, hasta una concentración de dosificación de 1,7-17 nmol/ml en dependencia de las respectivas dosis. Los animales se dosificaron una vez, al comenzar el experimento, por vía s.c. con una dosis-volumen de 6 ml/kg (es decir 300 µl por ratón de 50 g).

El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evaluó ½h antes (8.30 am), y después se pesaron los ratones. El derivado de GLP-1 se dosificó aproximadamente a las 9 am (tiempo 0). El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evaluó en los tiempos 1, 2, 4 y 8 horas (10 am, 11 am, 1 pm y 5 pm).

En los días siguientes, la glucosa en sangre se evaluó a las 24 horas, 48 horas, 72 horas, y 96 horas. Los ratones se pesaron todos los días después del muestreo de glucosa en sangre.

Los ratones se pesaron individualmente en una balanza digital.

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 µl, se colectó en capilares heparinizados y se transfirió a 500 µl del tampón de glucosa (solución del sistema EKF, Eppendorf, Alemania). La concentración de glucosa se midió mediante el uso del método de glucosa oxidasa (analyzer 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.

Los datos se presentan como por ciento del cambio de glucosa en sangre o del peso corporal medido en los puntos de tiempo a 48 horas y a 96 horas. Por ejemplo, el por ciento de cambio del nivel de glucosa en sangre a 48 horas para cada individuo se calculó como sigue:  $[(\text{nivel de glucosa en sangre a 48 horas}) - (\text{nivel de glucosa en sangre basal})] / (\text{nivel de glucosa en sangre basal}) \times 100 \%$ , donde el nivel de glucosa en sangre basal se refiere al nivel antes de la administración de cualquier tratamiento - y viceversa para el cambio del peso corporal. Un valor negativo se refiere a un % de reducción.

Se obtuvieron los resultados siguientes (promedios de todas las determinaciones individuales correspondientes a los tratamientos respectivos):

Tabla 4: Efecto sobre la glucosa en sangre y el peso corporal en ratones db/db

Compuesto del ejemplo núm.	% de cambio de glucosa en sangre		% de cambio en peso corporal	
	48 horas	96 horas	48 horas	96 horas
1	-61	-21	-6	-3
2	-37	-31	-4	-2
3	-58	-22	-5	-3
4	-30	-18	-4	-3
5	-28	-33	-4	-3
6	-30	-21	-3	-4
7	-49	-17	-4	-1
8	-39	-31	-4	-4
10	-17	-3	-3	-3

Todos los derivados analizados mostraron efecto in vivo de disminución de BG así como también de BW después de 48 horas así como también después de 96 horas.

#### Ejemplo 33: Estudio farmacodinámico en cerdos LYD

El propósito de este experimento es investigar el efecto de los derivados de GLP-1 sobre la ingesta de alimentos en cerdos. Esto se hace en un estudio farmacodinámico (PD) como se describe a continuación, en el cual la ingesta de alimentos se mide de 1 a 4 días después de la administración de una dosis única del derivado de GLP-1, en comparación con un grupo 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 la 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 de la ingesta individual de alimentos. Los animales se alimentaron ad libitum con alimento para cerdos (Svinefoder Danish Top o HRC Sow and Weaner Diet) en todos los momentos durante la adaptación y durante el periodo experimental. La ingesta de alimentos se controló en línea mediante el registro del peso del alimento cada 15 minutos, o manualmente. El peso del alimento se registró diariamente para cada animal (periodos de 24 horas) a partir del día 2 hasta el día 6 (120 horas) después de la dosis, administración incluida.

Los derivados de GLP-1 primero se disolvieron en un tampón fosfato (fosfato 50 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 8; o fosfato 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4) a la concentración deseada (tal como 12, 40, 120, 400 o 1200 nmol/ml correspondiente a las dosis de 10, 15, o 30 nmol/kg). El tampón fosfato sirve como vehículo. Los animales se dosificaron con una dosis única subcutánea del derivado de GLP-1 o vehículo (volumen usual 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 de la vena cava yugular/anterior para medir la exposición en plasma del derivado de GLP-1. Los animales se reutilizaron durante tres experimentos. El contenido de los derivados de GLP-1 en plasma se analizó mediante el uso de LOCI.

La ingesta de alimentos se calculó como la ingesta de alimentos media en 24 horas en intervalos de 24 horas (0-24 horas, 24-48 horas, 48-72 horas y 72-96 horas) y puede, por ejemplo, indicarse como porcentaje de la ingesta de alimento del grupo vehículo en el mismo intervalo de tiempo.

5 Las comparaciones estadísticas de la ingesta de alimentos en los intervalos de 24 horas en el grupo vehículo frente al del derivado de GLP-1 se realizaron mediante el uso de ANOVA de mediciones repetidas de dos vías, seguido por la prueba posterior de Bonferroni.

<110> Novo Nordisk A/S

10 <120> Derivados de péptidos similares a GLP-1, y sus usos

<130> 8706WO01

15 <160> 14

<170> Novo Nordisk A/S PatSeq 1.0.5.5

<210> 1

20 <211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

30 <210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Análogo de GLP-1

<220>

40 <221> Mod\_Res

<222> (2)..(2)

<223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"

<400> 2

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

50 Gly Gly Ser Lys

35

<210> 3

<211> 36

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de GLP-1

60 <220>

<221> Mod\_Res

<222> (2)..(2)

<223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"

65 <400> 3

# ES 2 713 185 T3

```

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

<210> 4
10 <211> 36
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Análogo de GLP-1

<220>
<221> Mod_Res
<222> (2)..(2)
20 <223> /mod_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"

<400> 4

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

30 <210> 5
   <211> 36
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

35 <220>
   <223> Análogo de GLP-1

<220>
40 <221> Mod_Res
   <222> (2)..(2)
   <223> /mod_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"

<400> 5

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

<210> 6
55 <211> 36
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Análogo de GLP-1

<220>
<221> Mod_Res
<222> (2)..(2)
65 <223> /mod_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"

<400> 6

```

ES 2 713 185 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 5 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Lys Gly Gly  
                   20                  25                  30  
 Gly Gly Ser Lys  
                   35  
  
 <210> 7  
 10 <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
 15 <223> Análogo de GLP-1  
  
     <220>  
     <221> Mod\_Res  
     <222> (2)..(2)  
 20 <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
     <400> 7  
  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Lys Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 25 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly  
                   20                  25                  30  
 Gly Gly Ser Lys  
                   35  
 30  
     <210> 8  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
 35  
     <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
  
     <220>  
 40 <221> Mod\_Res  
     <222> (1)..(1)  
     <223> /mod\_res= "Imp (Ácido 3-(imidazol-5-il)propanoico)"  
  
     <220>  
 45 <221> Mod\_Res  
     <222> (2)..(2)  
     <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
     <400> 8  
 50  
 Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                   20                  25                  30  
 55 Gly Gly Ser Lys  
                   35  
  
     <210> 9  
     <211> 36  
 60 <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
 65

ES 2 713 185 T3

<220>  
 <221> Mod\_Res  
 <222> (2)..(2)  
 <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
 5  
 <400> 9  
  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 10 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Lys Gly Ala  
                   20                  25                  30  
 Glu Ser Pro Lys  
                   35  
  
 15 <210> 10  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
  
     <220>  
     <221> Mod\_Res  
 25 <222> (2)..(2)  
     <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
     <400> 10  
  
 30 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Lys Gly Glu  
                   20                  25                  30  
 Gly Pro Ala Lys  
                   35  
  
 35 <210> 11  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
  
 45 <220>  
     <221> Mod\_Res  
     <222> (2)..(2)  
     <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
 50 <400> 11  
  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 55 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Lys Gly Pro  
                   20                  25                  30  
 Ala Ser Glu Lys  
                   35  
  
 60 <210> 12  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
 65 <223> Análogo de GLP-1

ES 2 713 185 T3

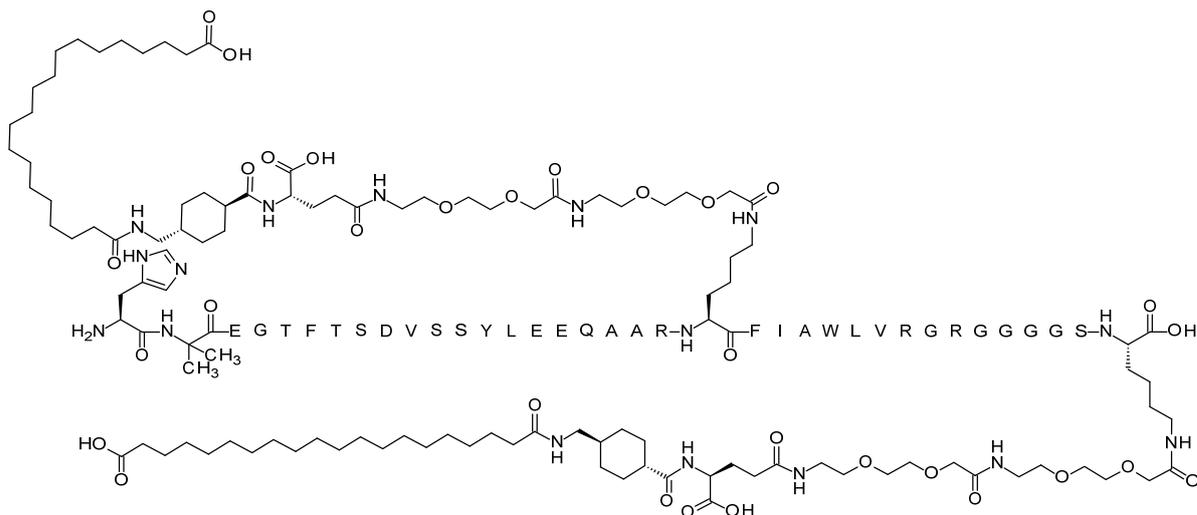
<220>  
 <221> Mod\_Res  
 <222> (2)..(2)  
 <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
 5  
 <400> 12  
  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 10 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                   20                  25                  30  
 Pro Glu Gly Lys  
                   35  
  
 15 <210> 13  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
     <220>  
     <221> Mod\_Res  
     <222> (2)..(2)  
 25 <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
     <400> 13  
  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
 30  1                  5                  10                  15  
 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                   20                  25                  30  
 Ser Ala Glu Lys  
                   35  
  
 35 <210> 14  
     <211> 36  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
     <223> Análogo de GLP-1  
  
     <220>  
 45 <221> Mod\_Res  
     <222> (2)..(2)  
     <223> /mod\_res= "Aib (Ácido 2-aminoisobutírico)"  
  
     <400> 14  
 50  
 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys  
                   20                  25                  30  
 55 Ser Pro Glu Lys  
                   35

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de GLP-1 seleccionado de lo siguiente:

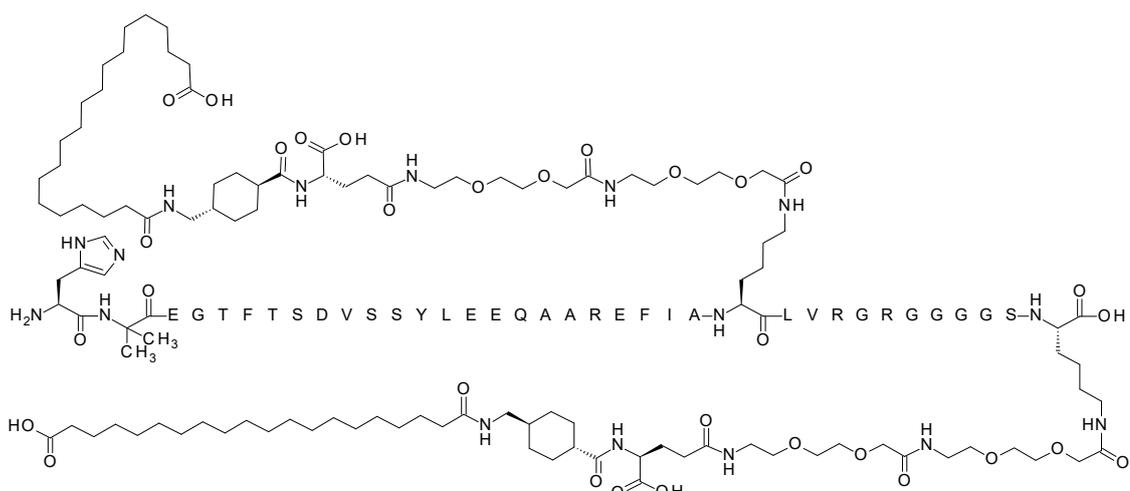
N{Épsilon-27}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Lys27,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,

Quím. 21:



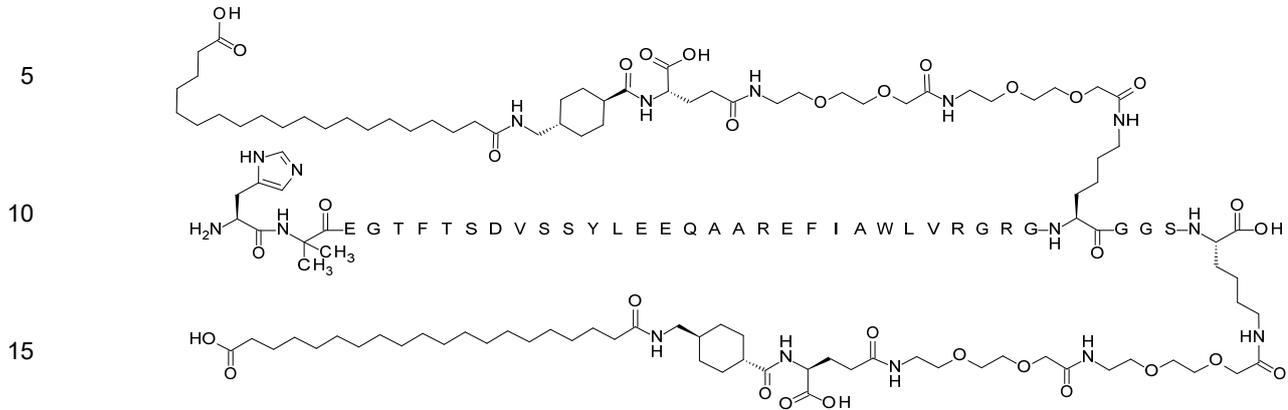
N{Épsilon-31}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Lys31,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,

Quím. 22:



N{alfa}[Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,

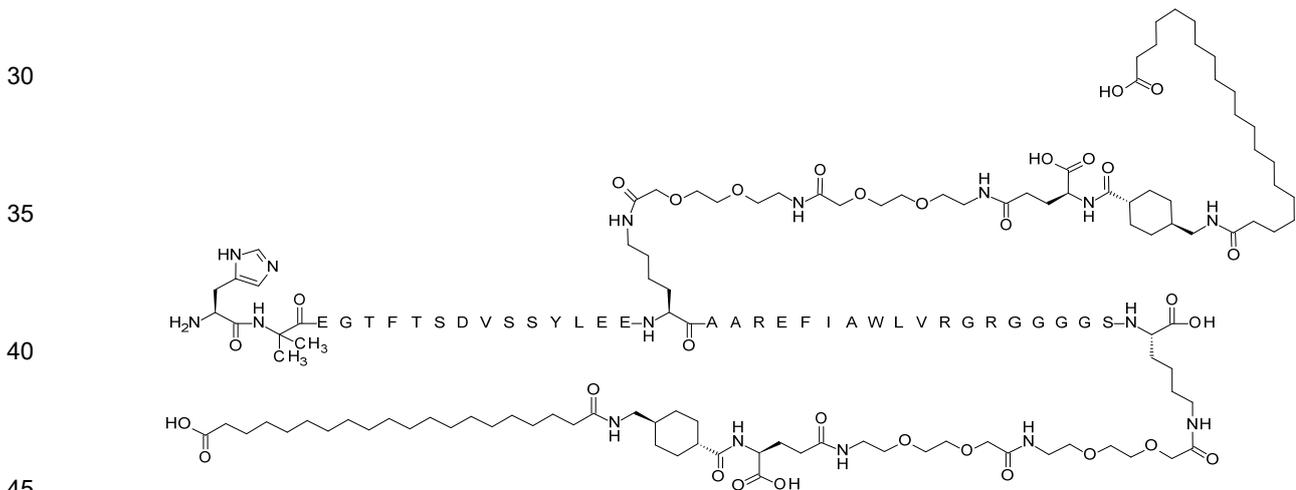
Quím. 23:



20 N{Épsilon-23}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]-[Aib8, Glu22, Lys23, Arg26, Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-  
 [[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]Lys,

25

Quím. 24:



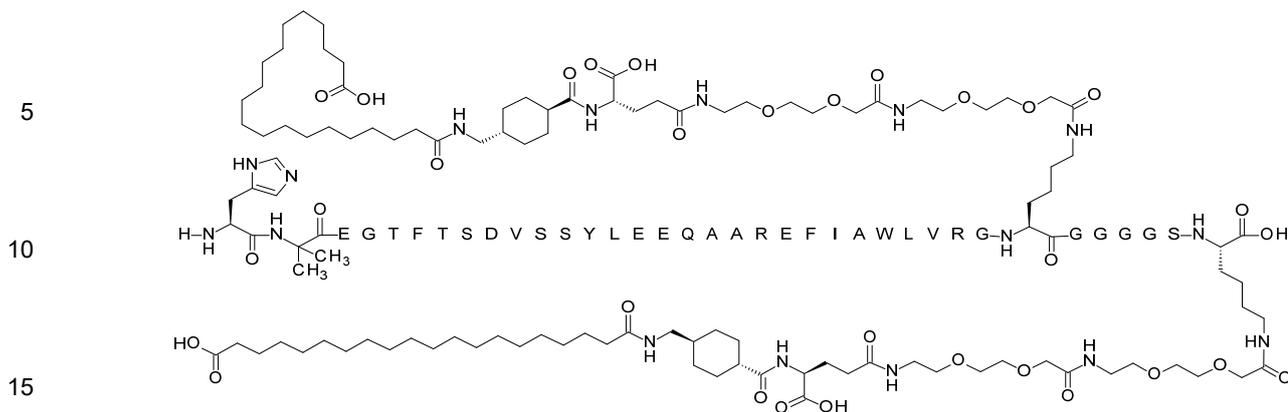
50 N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]-[Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-  
 [[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 i]acetil]Lys,

55

Quím. 25:

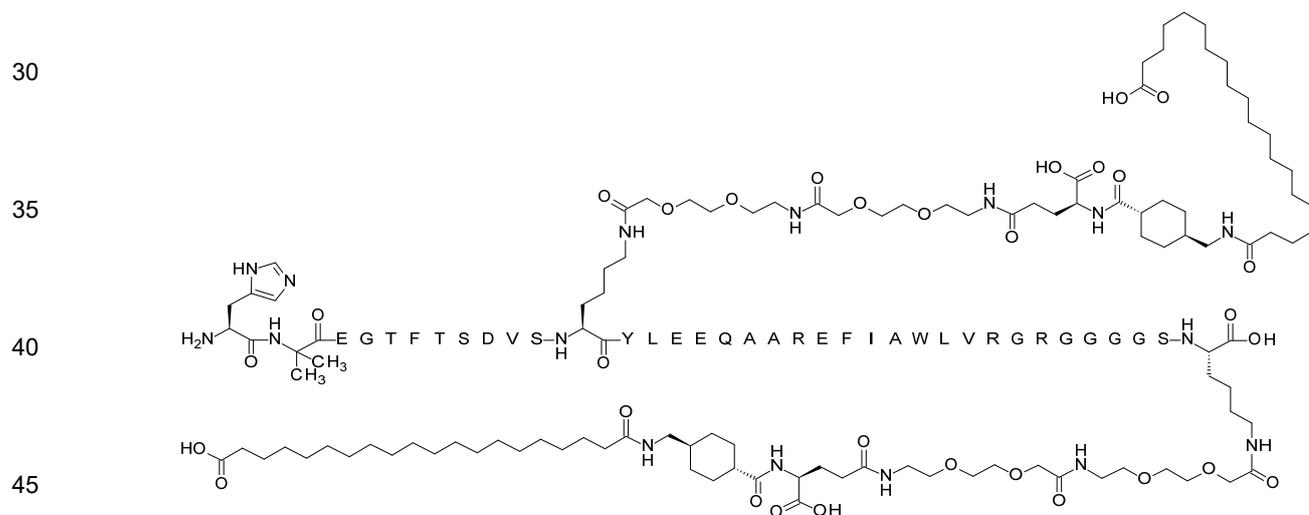
60

65



20 N{Épsilon-18}-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]-[Aib8,Lys18,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-  
 [[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]Lys,

25 Quím. 26:

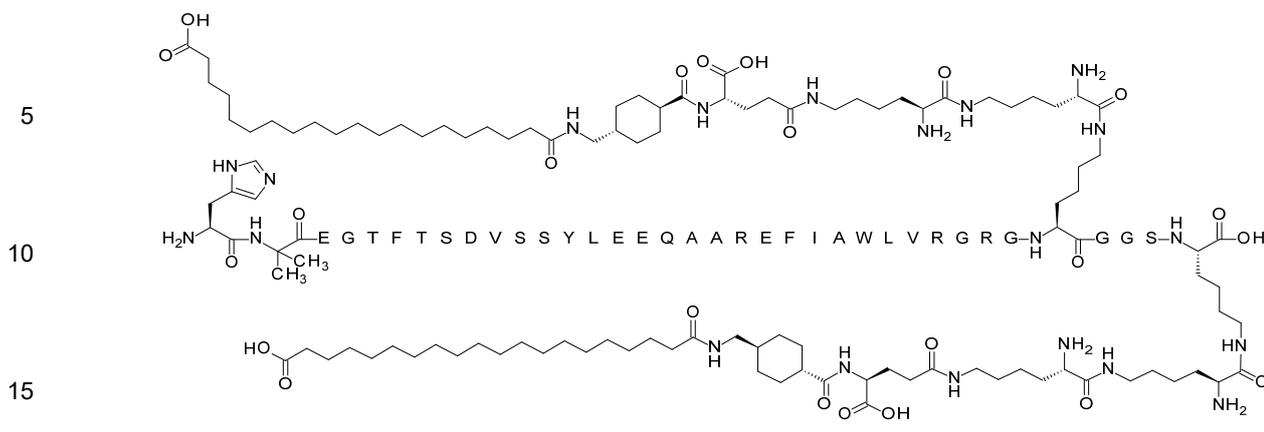


50 N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[(2S)-2-amino-6-[[2S)-2-amino-6-[[4S)-4-  
 carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys-Gly-  
 Gly-Ser-N{Épsilon}[(2S)-2-amino-6-[[2S)-2-amino-6-[[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys,

55 Quím. 27:

60

65

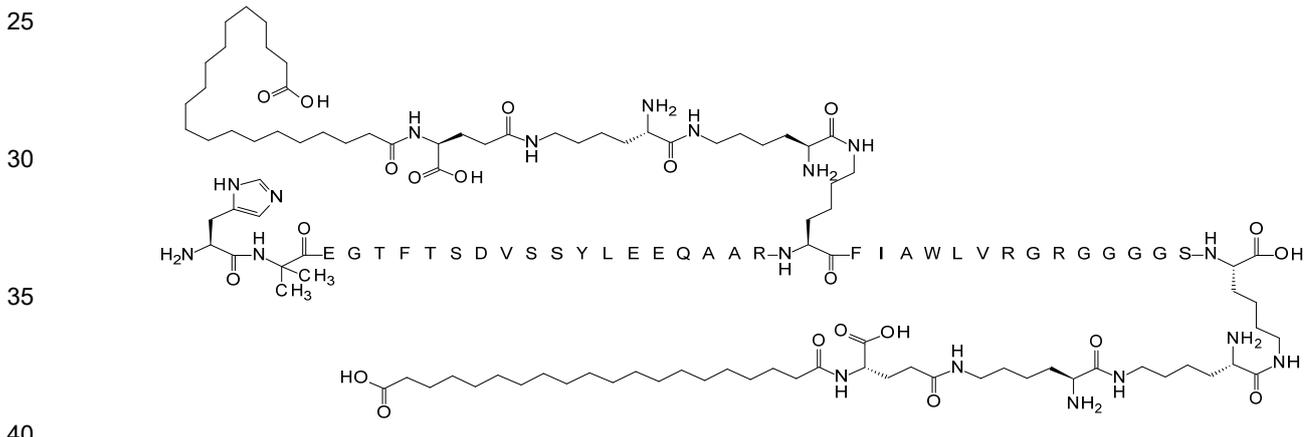


20

N{Épsilon-27}-[(2S)-2-amino-6-[[2S)-2-amino-6-[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib8,Glu22,Arg26,Lys27,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Gly-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[(2S)-2-amino-6-[[2S)-2-amino-6-[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]Lys,

25

Quím. 28:



45

N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(21-carboxihenicanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(21-carboxihenicanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil]Lys,

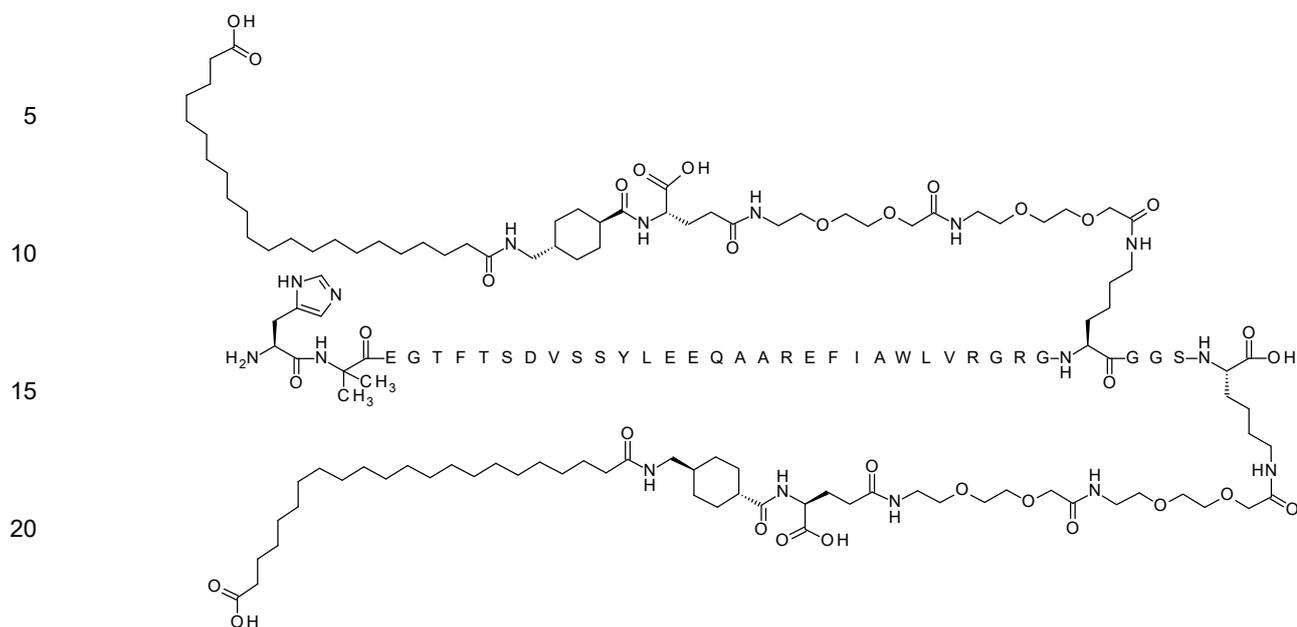
50

Quím. 29:

55

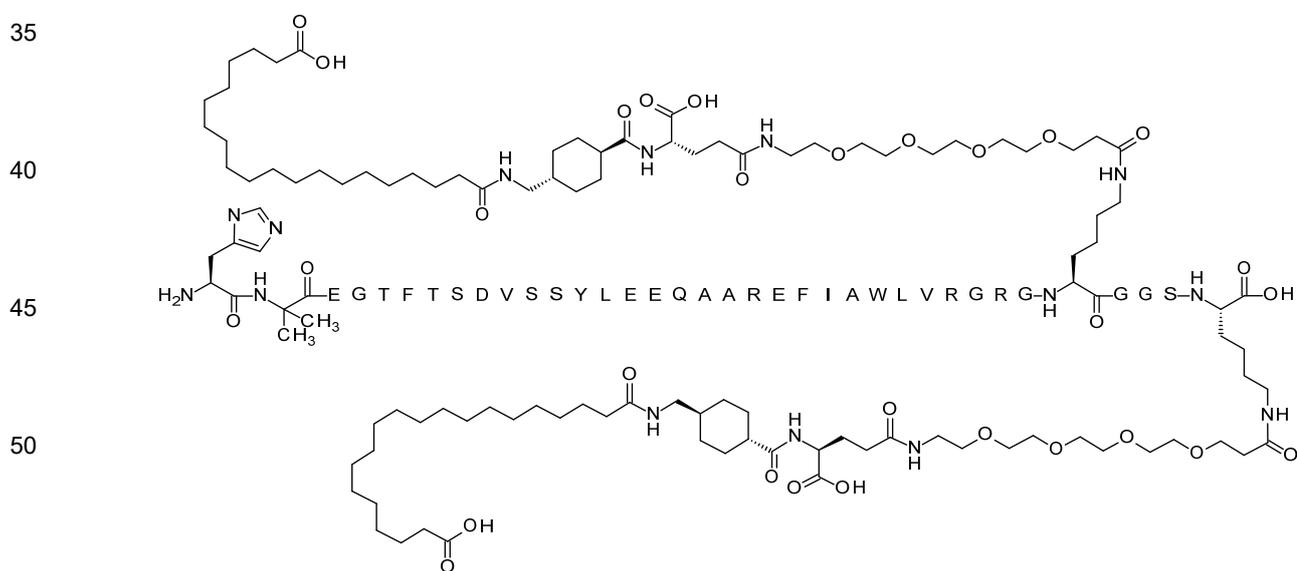
60

65



N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}3-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoicLys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}3-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoicLys

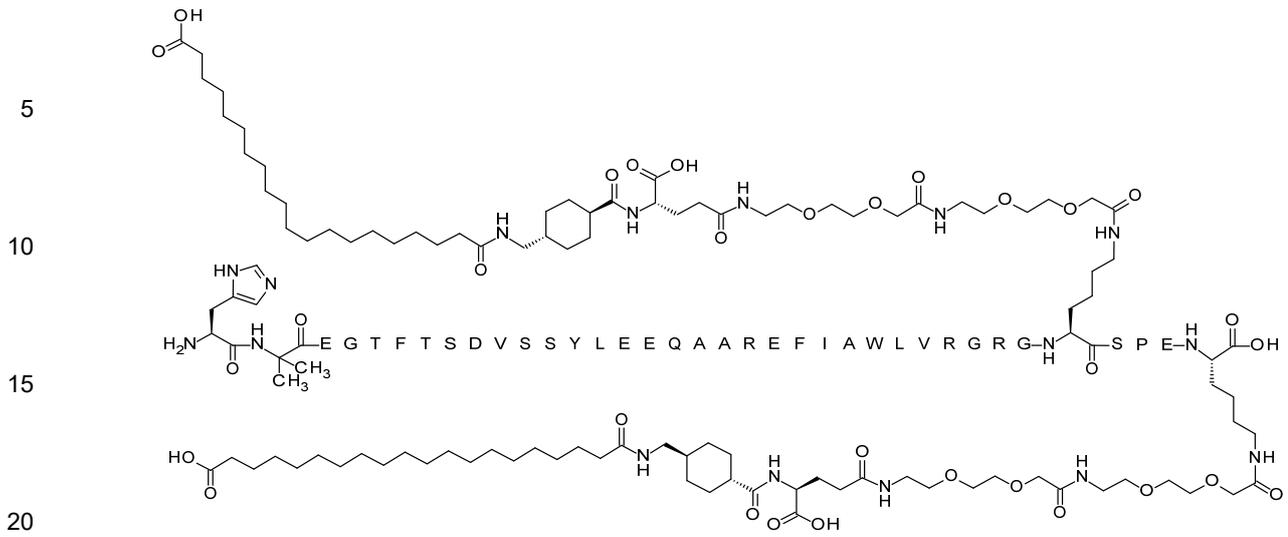
Quím. 30:



N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Ser-Pro-Glu-N{Épsilon}2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,

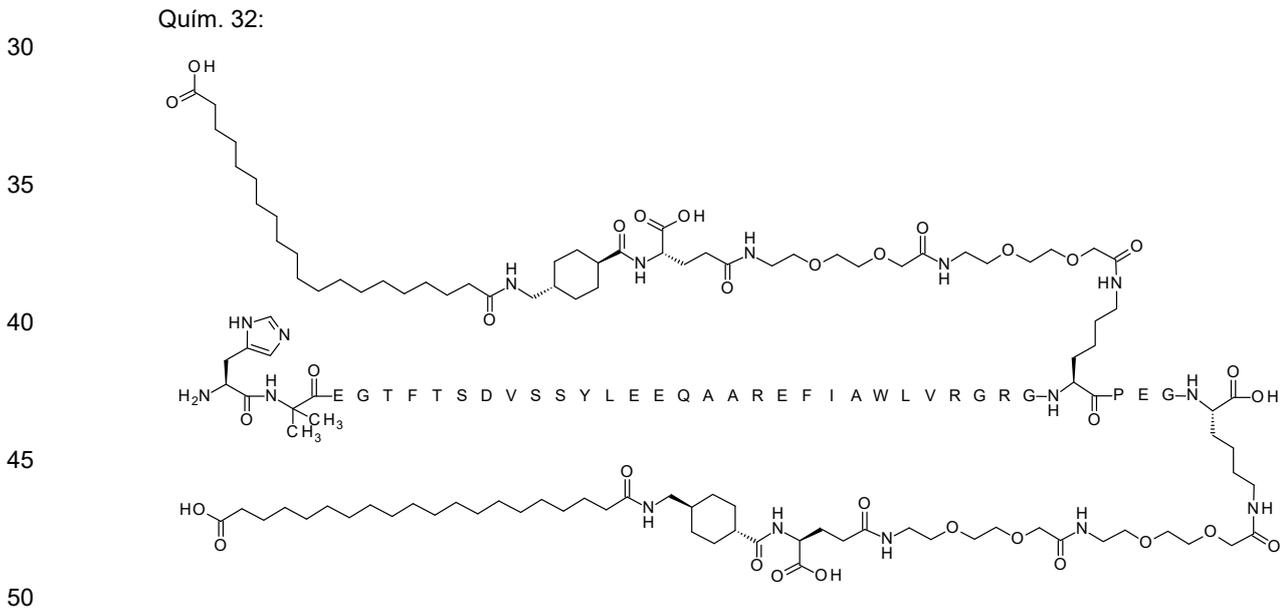
Quím. 31:

65



25

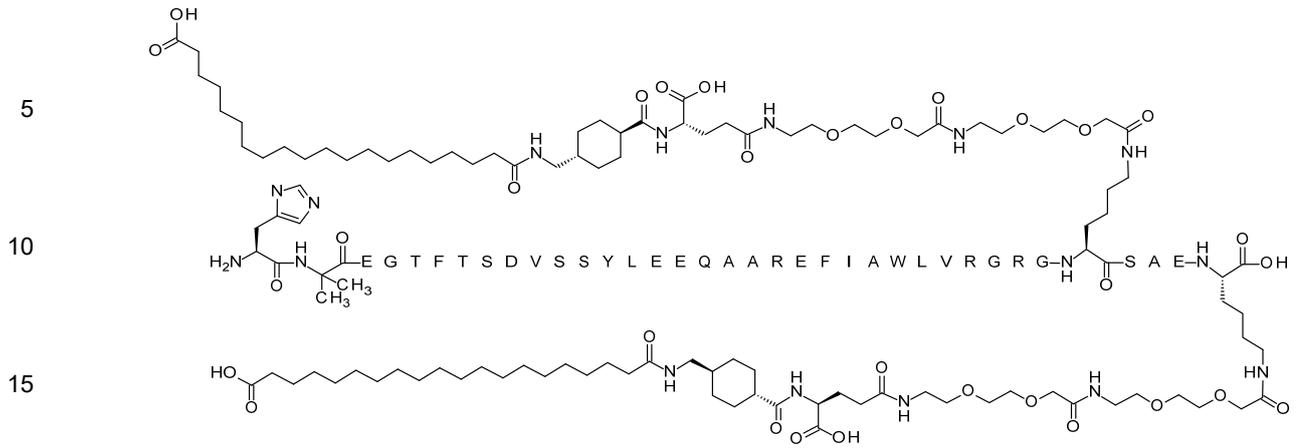
N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Pro-Glu-Gly-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,



55

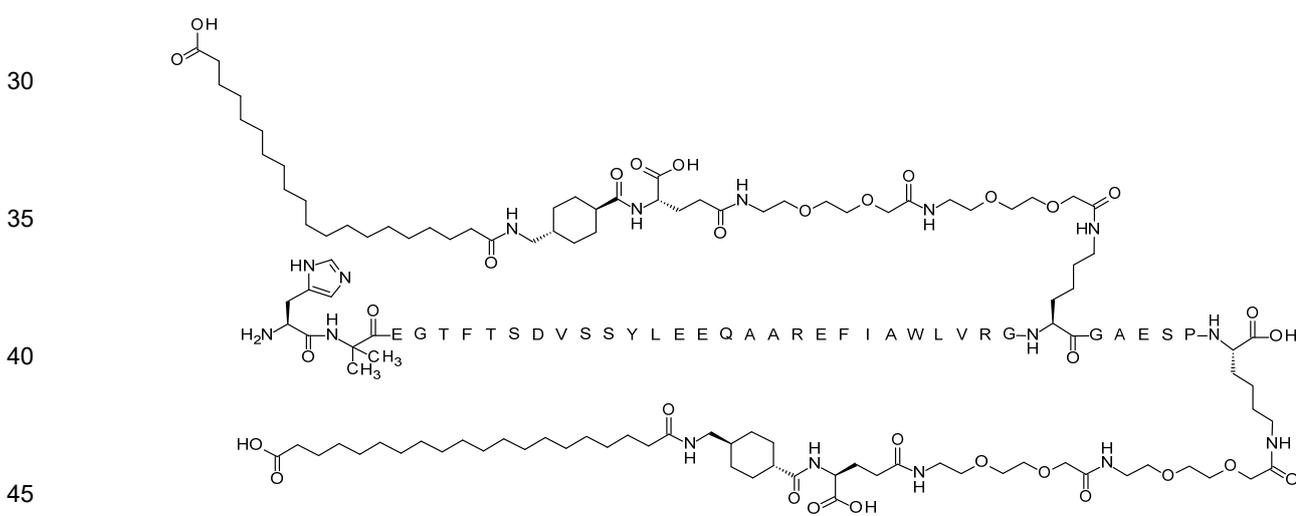
N{alfa}([Aib8,Glu22,Arg26,Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Ser-Ala-Glu-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,





20 N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]-[Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Ala-Glu-Ser-Pro-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-  
 [[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]Lys,

25 Quím. 34:



50 N{Épsilon-36}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]-[Aib8, Glu22, Arg26, Arg34, Lys36]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Pro-Ala-Ser-Glu-N{Épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-  
 [[4S)-4-carboxi-4-[4-[(19-  
 carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]  
 acetil]Lys,

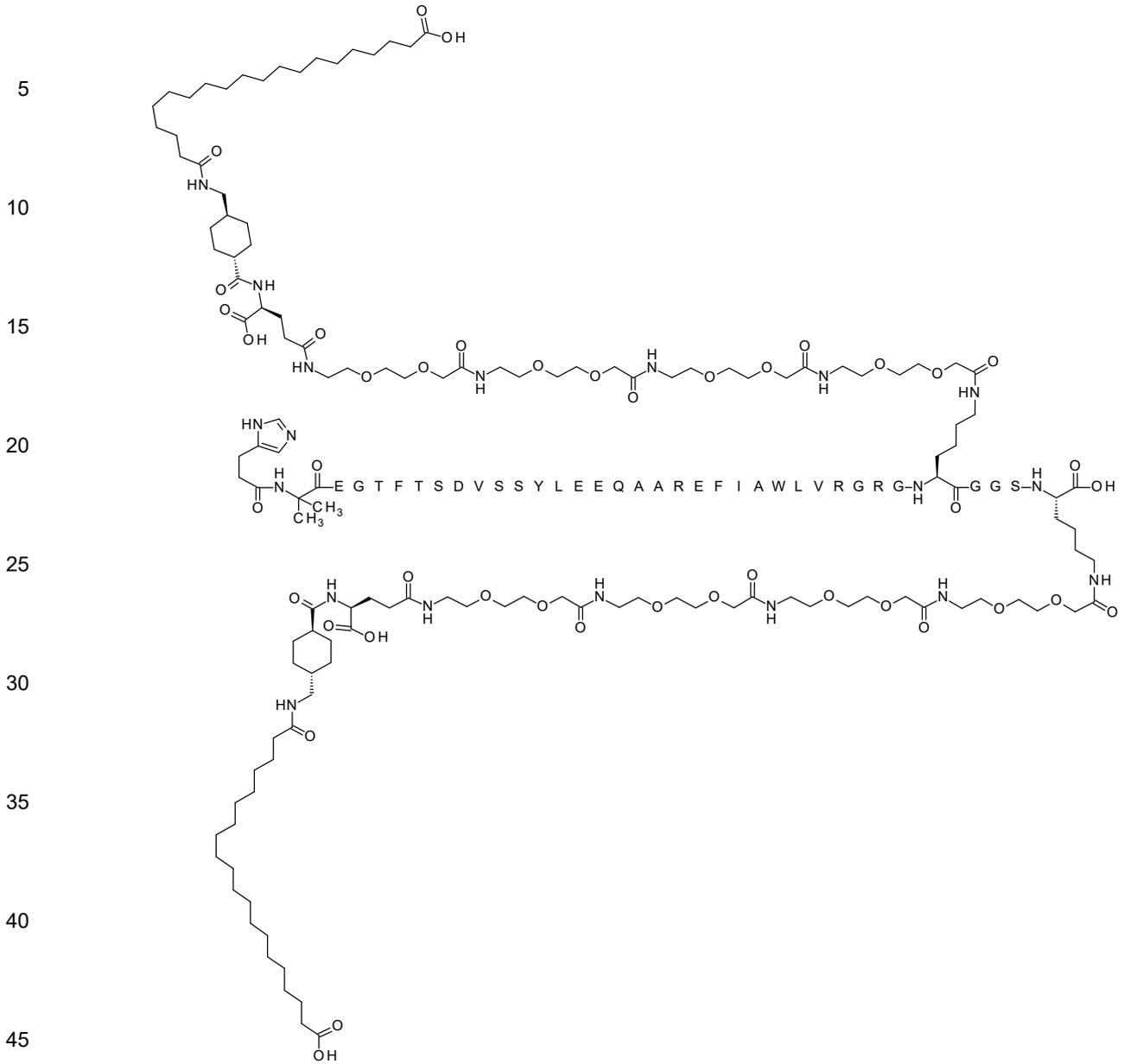
55 Quím. 35;

60

65







N{alpha}([Aib8, Glu22, Arg26, Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys,

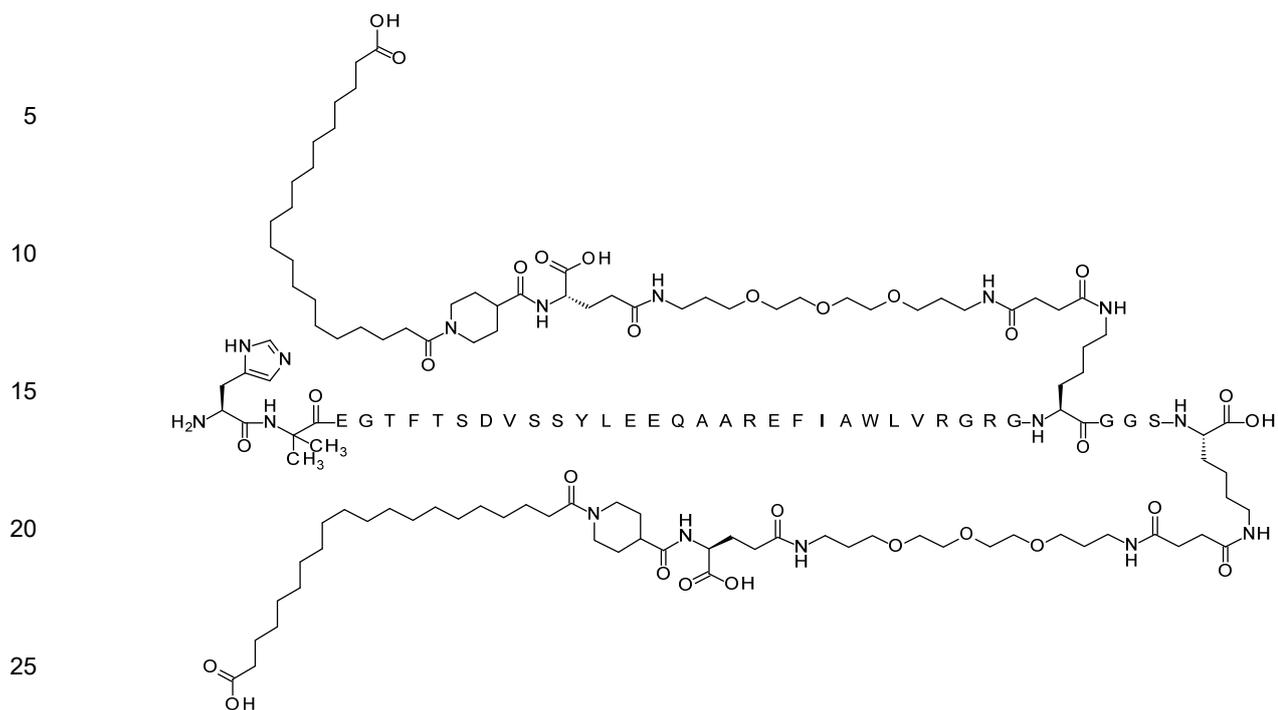
Quím. 39:

60

65

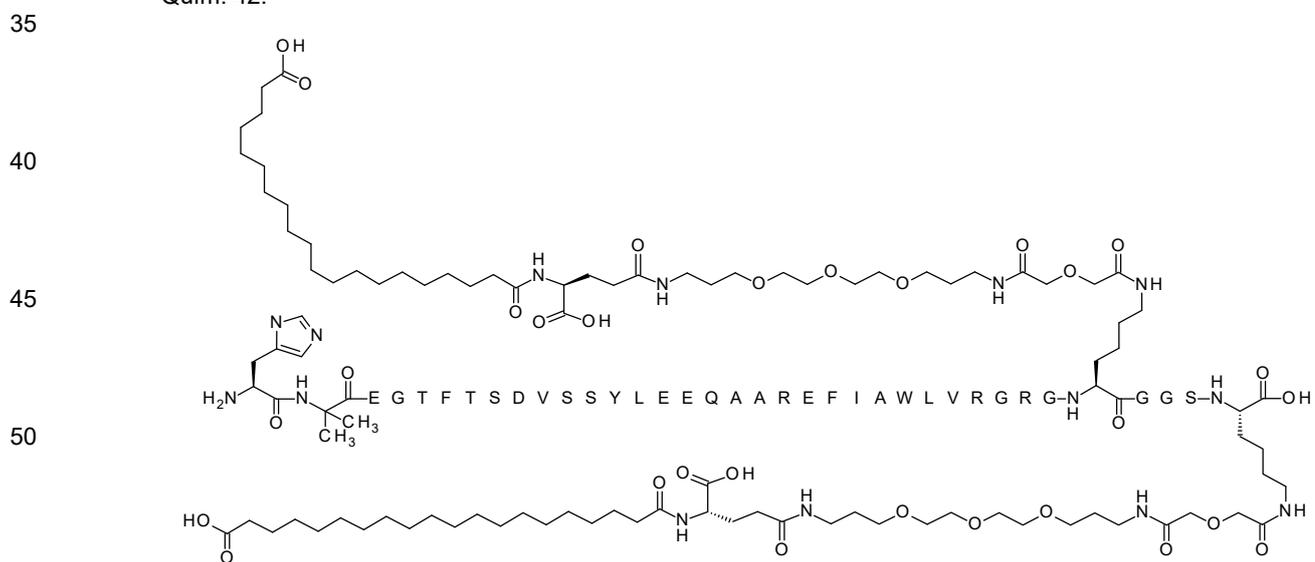






30 N{alfa}([Aib8, Glu22, Arg26, Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[2-[2-[3-[2-[2-[3-[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-2-oxoetoxi]acetil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[2-[2-[3-[2-[2-[3-[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-2-oxoetoxi]acetil]Lys,

Quím. 42:



60 N{alfa}([Aib8, Glu22, Arg26, Arg34]-GLP-1-(7-37)-peptidil)-N{Épsilon}[4-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxobutanoil]Lys-Gly-Gly-Ser-N{Épsilon}[4-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanecarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxobutanoil]Lys,

Quím. 43:

65







- (ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;
- 5
- (iii) mejorar la función de las células  $\beta$ , tal como disminuir la apoptosis de las células  $\beta$ , aumentar la función de las células  $\beta$  y/o la masa de células  $\beta$ , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células  $\beta$ ;
- (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;
- 10
- (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;
- 15
- (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía;
- 20
- (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL: disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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;
- 25
- (viii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (aterosclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;
- 30
- (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;
- 35
- (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;
- 40
- (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);
- 45
- (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;
- 50
- (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o
- (xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.
- 55
5. Uso de un derivado de conformidad con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para
- (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;
- 60
- (ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardar o evitar la resistencia a la insulina y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;
- 65

- (iii) mejorar la función de las células  $\beta$ , tal como disminuir la apoptosis de las células  $\beta$ , aumentar la función de las células  $\beta$  y/o la masa de células  $\beta$ , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células  $\beta$ ;
- 5 (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y/o esclerosis múltiple;
- 10 (v) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratar o evitar el trastorno por atracones, 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; aumentar la movilidad física; y/o evitar y/o tratar las comorbilidades de la obesidad, tal como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;
- 15 (vi) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, neuropatía, lo que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía;
- 20 (vii) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, la disminución de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; disminución de LDL densa y pequeña; disminución de VLDL; disminución de triglicéridos; reducir el colesterol; 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;
- 25 (viii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome X, aterosclerosis, infarto del miocardio, enfermedad coronaria, daño por reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o reoclusión con stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;
- 30 (ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino corto, o enfermedad de Crohn o colitis; dispepsia, y/o úlceras gástricas; y/o inflamación, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, y/o lupus eritematoso sistémico;
- 35 (x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en un paciente; prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o estabilización de la glucosa sanguínea, equilibrio de la insulina y opcionalmente del metabolismo en pacientes en unidades de cuidados intensivos con enfermedades agudas;
- 40 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS);
- 45 (xii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como isquemia cerebral, hemorragia cerebral y/o lesión cerebral traumática;
- (xiii) prevención y/o tratamiento de la apnea del sueño; y/o
- 50 (xiv) prevención y/o tratamiento del abuso, tal como abuso de alcohol y/o abuso de fármacos.