

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 503**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015 PCT/EP2015/080969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15817847 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3236991**

54 Título: **Derivados de FGF21 y sus usos**

30 Prioridad:

23.12.2014 EP 14199935

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**WIECZOREK, BIRGIT;
TAGMOSE, TINA MØLLER;
SASS-ØRUM, KRISTIAN;
ANDERSEN, BIRGITTE y
OLSEN, JØRGEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 742 503 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 FGF21 y sus usos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de análogos de FGF21, más en particular a análogos de FGF21 que tienen una cadena lateral en la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181, y su uso farmacéutico.

10 Antecedentes de la invención

FGF21 pertenece a la subfamilia FGF19 de los factores de crecimiento de fibroblastos atípicos (FGF) con efectos metabólicos en lugar de mitogénicos. FGF21 se une y activa a los receptores de FGF (FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c) pero solo en presencia del correceptor beta-klotho que no señala (BKL). La expresión específica tisular de BKL determina la actividad metabólica de FGF21. Los ratones transgénicos FGF21 son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y tienen mayor longevidad. FGF21 es un regulador metabólico del gasto de energía, metabolismo de glucosa y lípidos, con un gran potencial para invertir el peso corporal, hiperglicemia y dislipidemia en pacientes obesos con diabetes y dislipidemia.

20 FGF21 sufre de inestabilidad in vivo debido a la proteólisis, y tanto como la mitad del FGF21 humano circulante endógeno es inactivo. La pérdida de actividad se debe a la degradación del C-terminal, la mayoría de estos metabolitos terminan en P171 en lugar de S181. Por lo tanto la protección contra la ruptura metabólica en la región C-terminal es conveniente para una molécula FGF21 terapéutica. La modificación genética de la región C-terminal puede protegerse contra la degradación, sin embargo hasta el momento tal modificación genética ha llegado al costo de disminución o
25 pérdida de potencia del compuesto FGF21 modificado genéticamente. La región N-terminal de FGF21 se une a los FGFR mientras que la región C-terminal de FGF21 se une a BKL. Los truncamientos de aminoácidos C-terminales conducen a una pérdida significativa de la potencia.

30 La PEGilación en la posición 180 de [180C]FGF21 resulta en una reducción drástica en la actividad in vitro (J. Xu y otros, Bioconjugate Chemistry (2013), 24, 915-925). La proteína de fusión Fc que resulta de unir Fc al C-terminal de FGF21 es mucho menos potente que el FGF21 nativo y la fusión Fc N-terminal de FGF21 (Hecht y otros, PLoS One 2012, 7(11), e49345).

35 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a derivados de FGF21 que tienen una cadena lateral en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181 en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1). La presente invención se refiere a derivados de FGF21 que tienen una cadena lateral en una posición correspondiente a una de las posiciones 180 o 181 en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1). Más
40 en particular, la cadena lateral se une covalentemente a la posición de un análogo de FGF21 que corresponde a la posición 180 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o se une covalentemente a la posición de un análogo de FGF21 que corresponde a la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

45 Más en particular, la cadena lateral se une covalentemente a la posición de un análogo de FGF21 que corresponde a la posición 170, 174 o 175 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o se une covalentemente a la posición de un análogo de FGF21 que corresponde a la posición 167, 171, 172 o 173 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

50 Una cisteína está presente en el análogo de FGF21 en la posición de la unión de la cadena lateral. La cadena lateral se une covalentemente al átomo de azufre del residuo de cisteína al cual se une la cadena lateral. La cadena lateral comprende un enlazador y un prolongador. El prolongador puede ser un diácido graso.

55 El enlazador puede comprender varios elementos enlazadores, tales como uno o más residuos de gGlu, y/o uno o más residuos Aco (Aco es ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico) y/o uno o más de otros dirradicales que incorporan un grupo *-NH y un grupo *-CO. El prolongador y el enlazador se conectan mediante un enlace amida. El enlazador se conecta al átomo de azufre de 180Cys o 181Cys de la proteína FGF21, a través de un enlace tioéter.

60 El enlazador puede comprender varios elementos enlazadores, tales como uno o más residuos de gGlu, y/o uno o más residuos Aco (Aco es ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico) y/o uno o más elementos Trx (Trx es ácido tranexámico), y/o uno o más *-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-* y/o uno o más de otros dirradicales que incorporan un grupo *-NH y un grupo *-CO. El prolongador y el enlazador se conectan mediante un enlace amida, mientras que el enlazador se conecta a la proteína FGF21 a través de un enlace tioéter a través del átomo de azufre de la cisteína en la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181.

65 La proteína FGF21 incorporada en el derivado de FGF21 de la invención es un análogo de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), el análogo que comprende un residuo de cisteína en una de las posiciones correspondientes a la posición 180 o posición 181 del FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

ES 2 742 503 T3

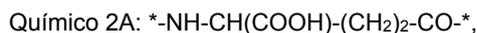
El análogo de FGF21 del derivado de la invención puede tener hasta 30 cambios de aminoácidos en total en comparación con el FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), de los cuales el residuo de cisteína en una de las posiciones 180 o 181 cuenta como un cambio de aminoácidos. Los 29 cambios adicionales pueden ser, independientemente, una o más extensiones, una o más inserciones, una o más deleciones, y/o una o más sustituciones.

En particular la invención se refiere, en un primer aspecto, a un derivado de una proteína FGF21, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador; en donde el prolongador se selecciona del grupo de



en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18; y en donde el enlazador comprende al menos uno de cada uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4;

en donde el Químico 2 se selecciona de:



en donde el Químico 3 es $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}^*$, en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

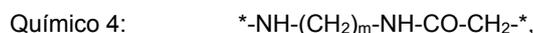
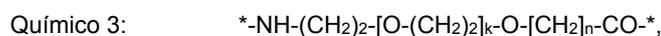
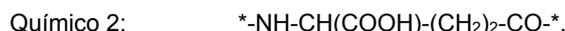
en donde el Químico 4 se selecciona de



en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5 y

en donde el Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $^*-\text{NH}$ al extremo CO^* del prolongador, y en su extremo CH_2^* al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

Más en particular la invención se refiere, en un primer aspecto, a un derivado de una proteína FGF21, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1); y un máximo de 30 modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1); en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador; en donde el prolongador es el Químico 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}^*$, en donde x es un número entero en el intervalo de 10-18; y en donde el enlazador comprende al menos uno de cada uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:



en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, n es un número entero en el intervalo de 1-5, y m es un número entero en el intervalo de 1-5. Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $^*-\text{NH}$ al extremo CO^* del prolongador, y en su extremo CH_2^*

al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

Los derivados de FGF21 preferidos de la invención designados del Compuesto 13 al Compuesto 24 se describen en la sección experimental.

5 Los derivados de FGF21 preferidos adicionales de la invención designados del Compuesto 13 al Compuesto 18 se describen en la sección experimental.

10 Los derivados de FGF21 preferidos adicionales de la invención designados del Compuesto 35 al Compuesto 41 se describen en la sección experimental.

Los derivados de FGF21 preferidos adicionales de la invención designados del Compuesto 43 al Compuesto 56 se describen en la sección experimental.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un análogo de FGF21 que comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1). Los análogos tienen preferentemente un alto grado de identidad con el FGF21 humano (SEQ ID NO:1). El grado de identidad puede describirse por la cantidad de sustituciones o modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano (SEQ ID NO:1).

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un análogo de FGF21 que comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), y un máximo de 30 modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

25 En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso farmacéutico de los derivados y análogos de FGF21 de la invención, por ejemplo, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, complicaciones diabéticas; y/o para mejorar los parámetro lipídicos, mejorar la función de las células β ; y/o para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética; y/o para el tratamiento y/o prevención de la esteatosis hepática y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHLA).

30 Los derivados de FGF21 de la invención son biológicamente activos. Por ejemplo son muy potentes, y, también o alternativamente, se unen muy bien a los receptores de FGF. Además, o alternativamente, tienen un perfil farmacocinético prolongado. Por ejemplo tienen una vida media terminal muy larga cuando se administran por vía i.v. a ratones y/o minicerdos. La combinación particular de buena potencia y larga vida media puede ser muy conveniente.

35 Es de interés que los derivados de FGF21 que comprenden una cadena lateral en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 humano maduro conserven la potencia.

40 Además, o alternativamente, se observa que los derivados de FGF21 que comprenden una cadena lateral en una posición correspondiente a una de las posiciones 180 y 181, y en particular la posición 180, de FGF21 humano maduro tienen alta potencia conservada.

Descripción

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

50 Un asterisco (*) en una fórmula química designa un punto de unión.

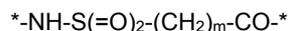
55 La invención se refiere, en un primer aspecto, a un derivado de una proteína FGF21, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1); en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador; en donde el prolongador se selecciona del grupo de



en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18; y en donde el enlazador comprende al menos uno de cada uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4;

65 en donde el Químico 2 se selecciona de:

ES 2 742 503 T3



y

5



en donde m se selecciona individualmente como un número entero en el intervalo de 1-5,

10 en donde el Químico 3 es $*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-[O-(CH}_2\text{)}_2\text{]}_k\text{-O-[CH}_2\text{]}_n\text{-CO-}^*$, en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

en donde el Químico 4 se selecciona de



15 y



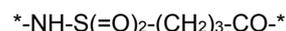
en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5.

20

En otras modalidades el Químico 2 se selecciona de



25



y



30 En una modalidad adicional, el Químico 2 es $*\text{-NH-CH(COOH)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}^*$.

En una modalidad adicional el Químico 2 es $*\text{-NH-S(=O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CO-}^*$.

En una modalidad adicional, el Químico 2 es $*\text{-NH-CH}_2\text{-ciclohexano-CO-}^*$.

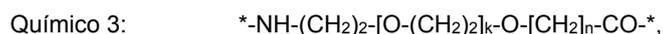
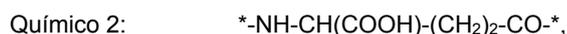
35

Como se mencionó anteriormente, el derivado incluye al menos uno de cada uno del Químico 2, Químico 3, y Químico 4 interconectadas por medio de enlaces amida. Además, se unen los elementos enlazadores en la secuencia indicada. El Químico 2 se conecta en su extremo $*\text{-NH}$ al extremo CO-^* del prolongador, y el Químico 4 está en su extremo $\text{CH}_2\text{-}^*$ enlazado al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

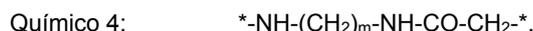
40

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un derivado de una proteína FGF21, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1); y un máximo de 30 modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1); en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador; en donde el prolongador es el Químico 1: $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO-}^*$, en donde x es un número entero en el intervalo de 10-18; y en donde el enlazador comprende al menos uno de cada uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:

50



55 y



en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, n es un número entero en el intervalo de 1-5, y m es un número entero en el intervalo de 1-5. Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $*\text{-NH}$ al extremo CO-^* del prolongador, y en su extremo $\text{CH}_2\text{-}^*$ al grupo tiol del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

60

Proteínas FGF21 y análogos

65

En la naturaleza la proteína FGF21 nativa se sintetiza con un péptido señal de 28 aminoácidos para la secreción. El polipéptido maduro FGF21 que consiste en los restantes 181 aminoácidos se incluye en la secuencia que se enumera como la SEQ ID NO:1.

La proteína FGF21 del derivado de la invención puede ahora y después referirse como la "cadena principal" o la "cadena principal de la proteína" del derivado o como un "análogo de FGF21".

El término "proteína FGF21" como se usa en la presente descripción se refiere a un análogo o variante del FGF21 humano (FGF21(1-181)), la secuencia del cual se incluye en el listado de secuencias como la SEQ ID NO:1. La proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1 puede denominarse también FGF21 "nativo", FGF21 "maduro", y/o FGF21 "humano maduro".

En el listado de secuencias, el primer residuo de aminoácido del FGF21 humano maduro de la SEQ ID NO:1 (histidina) se asigna el núm. 1.

Un ejemplo de un análogo de FGF21 es la proteína de la SEQ ID NO:1, que tiene una metionina N-terminal, también designada como MetFGF21 (SEQ ID NO:2). Cuando FGF21 humano maduro se expresa en *E. coli* se añade una Met N-terminal, ver, por ejemplo, el documento núm. WO 2006/050247, Tabla 6. Un residuo adicional de aminoácido N-terminal, que antecede la histidina en la posición 1 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1) se asigna la posición núm. -1. Los ejemplos no limitantes de la nomenclatura adecuada para MetFGF21 de la SEQ ID NO:2 son MetFGF21, [Met]FGF21 o [-1M]FGF21.

MetFGF21 muestra actividad biológica comparable al FGF21 humano maduro de la SEQ ID NO:1, y por razones prácticas se usa frecuentemente como compuesto de referencia en lugar del FGF21 humano maduro de la SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos de MetFGF21 se incluye en el listado de secuencias como la SEQ ID NO:2.

En la presente descripción, las proteínas FGF21 de la invención puede describirse mediante referencia a i) el número del residuo de aminoácido en el FGF21(1-181) humano maduro que corresponde al residuo de aminoácido que se cambia (es decir, la posición correspondiente en el FGF21 humano maduro), y ii) al cambio real.

Un aspecto de la invención se refiere a una proteína FGF21 (análogo FGF21) que comprende una sustitución de aminoácidos donde un residuo de aminoácido de tipo silvestre se sustituye por un residuo de cisteína. En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174 y 175 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 170, 171, 172, 173, 174, 175 y 180 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).

En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 169, 170, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174, 175 y 180 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174, 175 y 180 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174 y 175 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174 y 180 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173 y 174 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).

Por ejemplo, la proteína FGF21 de la invención se define de manera que comprende un residuo de Cys ya sea en la posición correspondiente a la posición 180 de FGF21(1-181) (SEQ ID NO:1) o en la posición correspondiente a la posición 181 de FGF21(1-181) (SEQ ID NO:1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1). En una modalidad la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).

Estos residuos de Cys de la proteína FGF21 de la invención pueden denominarse Cys180 y Cys181, respectivamente. Por ejemplo, una proteína FGF21 de la invención que tiene un residuo de Cys en la posición correspondiente a la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1) puede referirse como Cys181 FGF21 y/o como 181C FGF21, alternativamente [Cys181]FGF21 y/o como [181C]FGF21.

Lo siguiente es un ejemplo no limitante de la nomenclatura apropiada de los análogos.

Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 designa un análogo de FGF21 humano maduro, en donde una alanina se ha añadido al N-terminal (es decir Ala en la posición correspondiente a la posición -1 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1)), la asparagina presente de manera natural en la posición 121 se ha sustituido con glutamina, la metionina presente de manera natural en la posición 168 se ha sustituido con leucina, y la alanina presente de manera natural en la posición 180 se ha sustituido con cisteína.

Lo que sigue es un ejemplo no limitante de la nomenclatura adecuada para un derivado de un análogo de FGF21. S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]-
Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 designa un derivado de un análogo de FGF21 maduro humano (SEQ ID NO:1), en donde Ala[Gln121,Leu168,Cys180] designa los cambios de aminoácidos en comparación con FGF21 maduro humano (SEQ ID NO:1) con los números que se refieren a las posiciones de FGF21 maduro, y en donde el sustituyente [2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]- se une covalentemente al átomo de azufre de la cisteína en la posición correspondiente a la posición 180 en FGF21 maduro humano (SEQ ID NO:1).

La proteína FGF21 de la invención puede tener cambios de aminoácidos adicionales en comparación con FGF21 (SEQ ID NO:1), sin embargo se limita a un máximo de 30 cambios de aminoácidos. Estos cambios también son en comparación con FGF21(1-181) maduro humano (SEQ ID NO:1), y pueden también representar, independientemente, una o más sustituciones, inserciones, extensiones, y/o deleciones de aminoácidos.

En una modalidad particular los cambios de aminoácidos están en una o más posiciones correspondientes a una o más de las posiciones -1, 121, y 168 de FGF21 (SEQ ID NO:1).

En una modalidad la proteína FGF21 de la invención comprende -1Ala, 121Gln y 168Leu en adición a la sustitución del aminoácido de cisteína.

En una modalidad la proteína FGF21 de la invención comprende -1Ala, 121Gln, y 168Leu en adición a cualquiera de 167Cys, 170Cys, 171Cys, 172Cys, 173Cys, 174Cys, 175Cys, 180Cys y 181Cys. Las proteínas FGF21 particulares de la invención, que también se incorporan en los derivados particulares de la invención que se describen en la sección experimental, son SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del listado de secuencias.

En otra modalidad particular la proteína FGF21 de la invención comprende -1Ala, 121Gln, y 168Leu en adición a cualquiera de 180Cys o 181Cys.

Las proteínas FGF21 particulares de la invención, que también se incorporan en los derivados particulares de la invención que se describen en la sección experimental, son SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO:10 del listado de secuencias.

Una proteína "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, cuando se comparan con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

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" puede usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia de FGF21 como referencia a FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como la cantidad de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo mediante simple escritura e inspección visual; y/o puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "align" que se basa en un algoritmo de Needleman-Wunsch. Este algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa de alineamiento de Myers y W. Miller en "Alignments Optimum 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 residuos adicionales en una interrupción en -2 o preferentemente en -0,5.

Un ejemplo de tal alineación se inserta en la presente descripción más abajo, en el cual la secuencia núm. 1 es FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), y la secuencia núm. 2 es el análogo Ala[121Q, 168L, 181C]FGF21 (SEQ ID NO:10). La identidad calculada es por lo tanto 97,8 %.

1: FGF21

2: Ala[121Q, 168L, 181C]FGF21

Matriz: EBLOSUM62

donde se proporcionan estructura, nombre común, nombre sistemático, símbolos de una y tres letras para los 20 aminoácidos codificados.

5 El término "aminoácidos no codificados" se refiere a todos los otros aminoácidos. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no codificados son los isómeros D de los aminoácidos codificados tales como D-alanina y D-leucina.

10 En lo que sigue, se pretende que todos los aminoácidos específicos para los cuales no se indica el isómero óptico signifiquen el L-isómero (a menos que se especifique de otra manera), por ejemplo cuando se hace referencia al aminoácido específico de glutamina, esto se refiere a que se refiere a L-glutamina, a menos que se indique de cualquier otra manera. Por otro lado, cuando los aminoácidos se describen por fórmulas más generales tales como fórmulas brutas o fórmulas estructurales y cuando no se muestra ningún compuesto estereoquímico, estas fórmulas están destinadas a cubrir todos los estereoisómeros.

15 De acuerdo con la práctica general en la técnica el N-terminal de las proteínas FGF21 de la invención se muestra hacia la izquierda y el C-terminal hacia la derecha.

Derivados de FGF21

20 El término "derivado" como se usa en la presente descripción en el contexto de una proteína FGF21 o análogo significa una proteína FGF21 o análogo modificado químicamente, en el cual un número bien definido de sustituyentes se han unido covalentemente a uno o más residuos de aminoácidos específicos de la proteína. El(Los) sustituyente(s) puede(n) referirse, además, una cadena lateral o cadenas laterales.

25 En una modalidad particular, la cadena lateral es capaz de formar asociaciones no covalentes con albúmina, lo que promueve de esta manera la circulación del derivado con la corriente sanguínea y tienen además el efecto de proteger el tiempo de acción del derivado, debido al hecho de que la asociación del derivado de FGF21 y la albúmina se desintegra sólo lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo.

30 La cadena lateral comprende una porción que se denomina en la presente descripción como un prolongador.

El prolongador puede estar en, o cerca del extremo distante de la cadena lateral, con relación a su punto de unión a la proteína.

35 Aún en una modalidad particular adicional la cadena lateral comprende una porción entre el prolongador y el punto de unión a la proteína, cuya porción puede referirse como un enlazador. El enlazador puede consistir en uno o más elementos enlazadores.

40 En modalidades particulares, la cadena lateral y/o el prolongador es lipofílico, y/o cargado negativamente a pH fisiológico (7,4).

La cadena lateral puede unirse covalentemente a un residuo de cisteína de la proteína FGF21 mediante alquilación.

45 En una modalidad preferida, la cadena lateral se sintetiza y se activa con un grupo de haloacetamida, que reacciona con el grupo tiol de un residuo de cisteína, bajo la formación de un enlace tiol-carbono covalente (este proceso se denomina como Cys-alkilación) que también se denomina como enlace tio-éter. Por lo tanto, el grupo tiol no está presente en los derivados, y la cadena lateral está enlazada a través del átomo de azufre. En los casos en los que el grupo tiol se menciona en relación con un derivado, debe entenderse como el átomo de azufre que es parte del grupo tiol de la cisteína antes de la Cys-alkilación.

50 En otra modalidad, la cadena lateral se activa con un grupo maleimida, que reacciona con el grupo tiol de un residuo de cisteína, bajo la formación de un enlace covalente tiol-carbono.

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

En un aspecto, cada prolongador comprende, o consiste en, un prolongador de la fórmula del Químico 1:

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

en donde x es un número entero en el intervalo de 10–18.

En modalidades alternativas el prolongador Químico 1 se selecciona del grupo de prolongadores definidos por el Químico 1A, Químico 1B y Químico 1C

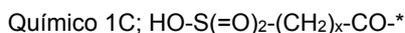
65 Químico 1A: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

ES 2 742 503 T3

en donde x es un número entero en el intervalo de 8–18,



5 en donde x es un número entero en el intervalo de 8–18, y



10 en donde x es un número entero en el intervalo de 8–18.

La longitud de la cadena de carbono definida por x puede variar de 8-18 para cada una de las diferentes estructuras del Químico 1, mientras que como se describe a continuación la versión más corta o más larga puede favorecer diferentes tipos de elementos prolongadores.

15 En una modalidad particular de 1A, $^*-(\text{CH}_2)_x^*$ se refiere a alquileo lineal en el que x es un número entero en el intervalo de 10-18, tal como 14-18 o tal como 14-16.

En otra modalidad particular de 1A, $^*-(\text{CH}_2)_x^*$ se refiere a alquileo lineal en el que x es 16. Este prolongador puede denominarse brevemente diácido C18, es decir un ácido dicarboxílico graso con 18 átomos de carbono. Cuando x=16 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 1a:



25 En una modalidad el prolongador es el Químico 1B. En una modalidad de 1B $^*-(\text{CH}_2)_x^*$ se refiere a alquileo lineal en el que x es un número entero en el intervalo de 8-14. En la modalidad particular cuando x=9 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 1b.



30 En una modalidad el prolongador es el Químico 1C. En una modalidad de 1C, $^*-(\text{CH}_2)_x^*$ se refiere a un alquileo lineal en el que x es un número entero en el intervalo de 10-18, tal como 12-18 o 14-18. En una modalidad particular de 1C, cuando x=15 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 1c



35 La nomenclatura es como es común en la técnica, por ejemplo en las fórmulas anteriores $^*-\text{CO}^*$ se refiere a carbonil ($^*-\text{C(=O)}^*$). Por ejemplo, en cualquier fórmula (R-CO^*) en la presente descripción (donde R es tal como se define por cada fórmula), R-CO^* se refiere a R-C(=O)^* . El benceno se refiere a la estructura de anillo que en el Químico 1B se sustituye en C1 y C4 por $\text{O-(CH}_2\text{)}_x^*$ y $-\text{COOH}$, respectivamente. HO-S(=O)_2 describe ácido sulfónico.

40 El enlazador del derivado de la invención comprende al menos uno de los siguientes elementos enlazadores Químico 2, Químico 3 y Químico 4. Los elementos Químico 2 y Químico 3 ambos sostienen un extremo $-\text{NH-}$ y CO- que les permite unirse mediante enlaces entre sí y a $-\text{CO-}$ o $-\text{NH-}$ del prolongador o Químico 4.

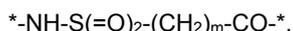
45 El Químico 4 tiene un extremo $-\text{NH-}$ (capaz de formar un enlace amida con el Químico 2 o Químico 3, y un extremo $-\text{NH-CO-CH}_2$, que en la forma sin reaccionar es una haloacetamida capaz de reaccionar con el grupo tiol de la cisteína del análogo de FGF21.

50 El enlazador del derivado de la invención comprende al menos uno de los siguientes elementos enlazadores Químico 2, Químico 3 y Químico 4,

en donde el Químico 2 se selecciona de:



55



60 y en donde m se selecciona individualmente como un número entero en el intervalo de 1-5.

en donde el Químico 3 es: $^*-\text{NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-[O-(CH}_2\text{)}_2\text{]}_k\text{-O-[CH}_2\text{]}_n\text{-CO}^*$, en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

65 en donde el Químico 4 se selecciona de:



y



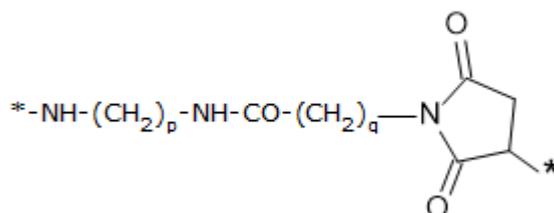
- 5 en donde m se selecciona individualmente como un número entero en el intervalo de 1-5.
- En una modalidad el Químico 2 es $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$, en donde m es 1, 2 o 3. En una modalidad m es 2 o 3.
- 10 En la modalidad donde m es 2, el elemento enlazador Químico 2 puede denominarse como Químico 2a que es $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$. El elemento enlazador $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$ puede denominarse brevemente gGlu, gamma Glu, o γ -Glu. En gGlu es el grupo carboxi gamma del aminoácido ácido glutámico que se usa para la conexión a otro elemento enlazador. En una modalidad particular, el (cada) elemento enlazador de gGlu está en la forma L.
- 15 En una modalidad el Químico 2 es $*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$, en donde m es 1, 2 o 3. En una modalidad m es 2 o 3. El elemento enlazador $*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$, es un derivado de ácido sulfónico, donde el grupo carboxi se usa para la conexión a otro elemento enlazador. En una modalidad m es 3 y el elemento enlazador Químico 2 puede denominarse como Químico 2b: $*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-*$.
- 20 En una modalidad el Químico 2 es $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{ciclohexano}-\text{CO}-*$, en donde m es 1, 2 o 3. En una modalidad m es 2 o 3. En la estructura del Químico 2, el anillo de ciclohexano se sustituye por lo tanto en C1 y C4 con NH-CH2 y CO respectivamente.
- 25 En una modalidad m es 1 y el elemento enlazador Químico 2 puede denominarse como Químico 2c: $*-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{ciclohexano}-\text{CO}-*$. Este elemento enlazador puede denominarse además Trx.
- En el elemento enlazador del Químico 3, "k" y "n" pueden variar entre 1 y 5. Cuando k=n=1 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 3a:
- 30 En una modalidad el Químico 3 es Químico 3a: $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-*$. El elemento enlazador del Químico 3a puede denominarse brevemente como Ado (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico) ya que es un dirradical de este.
- En el elemento enlazador del Químico 4, "m" puede variar entre 1 y 5. En una modalidad el Químico 4 es $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$, en donde m es 1, 2, 3 o 4. En una modalidad m es 2 o 3.
- 35 En una modalidad cuando el Químico 4 es $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ y m=2 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 4a: $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$.
- 40 En una modalidad del Químico 4 es $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ en donde m es 1, 2, 3 o 4. En una modalidad m es 2 o 3. En una modalidad m es 4 o 5.
- Cuando el Químico 4 es $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ y m=4 la estructura de este elemento enlazador corresponde al Químico 4b: $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$.
- 45 El enlazador del derivado de la invención puede comprender uno o más de estos tres tipos diferentes de elementos enlazadores, y puede comprender además uno o más de cada elemento enlazador individual. En una modalidad el enlazador comprende solamente un elemento del Químico 4. En una modalidad el enlazador comprende uno o más de cada uno de Químico 2 y Químico 3 y sólo un elemento del Químico 4.
- 50 Como un ejemplo no limitante, el enlazador puede consistir en un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3a, y un elemento del Químico 4, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $*-\text{NH}$ al extremo $\text{CO}-*$ del prolongador, y en su extremo $\text{CO}-*$ al átomo de azufre del residuo de Cys en la posición 180 o 181 de la proteína FGF21. Los elementos del Químico 4 se enlazan por lo tanto al extremo $\text{CO}-*$ de los elementos del químico2/químico3 al átomo de azufre del análogo de cisteína de FGF21.
- 55 En un ejemplo adicional, el enlazador puede consistir en dos elementos del Químico 2, tales como dos elementos del Químico 2a, dos elementos del Químico 3a, y un elemento del Químico 4, interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada. El elemento del Químico 2 se conecta en el extremo $*-\text{NH}$ al extremo $\text{CO}-*$ del prolongador, y el Químico 4 en su extremo CH_2-* al átomo de azufre del residuo de Cys de la proteína FGF21.
- 60 En una modalidad el enlazador se conecta al grupo tiol de la Cys en la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 173, 174, 175, 180 o 181 de la proteína FGF21. En modalidades adicionales, el enlazador se conecta al átomo de azufre de las Cys en la posición 180 o 181.
- 65

De más está decir, solo para el buen orden: La frase "en la secuencia indicada" significa que el extremo *-NH del primer elemento enlazador mencionado (aquí el Químico 2) está conectado al extremo *-CO del prolongador, y el extremo *-CO del último elemento enlazador mencionado (aquí el Químico 4) está conectado al grupo tiol amino del residuo de Cys en cuestión de la proteína FGF21.

- 5 En una modalidad el derivado de la invención se selecciona de los grupos que consiste en:
- a. Compuesto 13-24
- 10 b. Compuesto 35-41 y/o
- c. Compuesto 43-56.
En una modalidad adicional el derivado se selecciona del compuesto 13-24.
- 15 En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 13-18. En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 20-24.
- En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 35-41.
- 20 En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 43-56. En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 43-44 y 46-54. En una modalidad el derivado se selecciona del compuesto 44, 47 y 50-54.

En lugar del Químico 4, puede usarse un elemento enlazador derivado de maleimida donde p y q pueden variar entre 1 y 5:

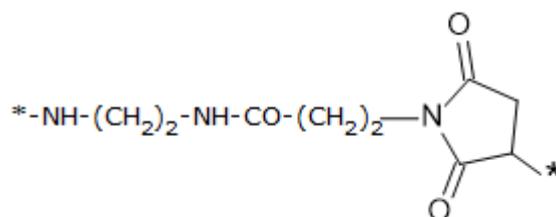
25



35

Cuando p=q=2 la estructura de este elemento enlazador corresponde a N-(2-aminoetil)-3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)propanamida:

40



50

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

55 Propiedades funcionales

Los derivados de FGF21 de la invención son biológicamente activos. Por ejemplo son muy potentes, y, también o alternativamente, se unen muy bien a los receptores de FGF. Además, o alternativamente, tienen un perfil farmacocinético prolongado. Por ejemplo tienen una vida media terminal muy larga cuando se administran por vía i.v. a ratones y/o minicerdos. La combinación particular de buena potencia y larga vida media puede ser muy conveniente.

60

Además, o alternativamente, es sorprendente que los derivados de FGF21 que comprenden una cadena lateral de la invención en una posición correspondiente a una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 173, 174, 175, 180 y 181 del FGF21 humano maduro tienen alta potencia.

65

De acuerdo con un primer aspecto, los derivados de FGF21 tienen actividad de FGF21. Por ejemplo, los derivados de FGF21 de la invención tienen una potencia sorprendentemente buena hacia los receptores de FGF humanos.

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

10 La potencia in vitro puede determinarse, por ejemplo, en un ensayo con células completas que expresan receptores de FGF humanos (FGFR1c, FGFR2c o FGFR3c) y BKL. Por ejemplo, la respuesta de los receptores de FGF humanos puede medirse mediante el uso de HEK (células Renales Embrionarias Humanas) que sobreexpresan beta-kloto humano (BKL). Las células HEK293 expresan endógenamente varios receptores de FGF, que incluyen FGFR1c y FGFR3c. Estas células no responden a FGF21 hasta ser transfectadas con el correceptor BKL. La activación del complejo receptor de FGF/BKL conduce a la activación de la vía de señalización MAPK/ERK y la fosforilación de ERK. El nivel de ERK fosforilado (pERK) en un punto de tiempo dado aumenta con concentraciones crecientes de FGF21. Un ejemplo no limitante de tal ensayo se describe en el Ejemplo 6.

15 La potencia in vitro también puede determinarse en un ensayo con adipocitos de ratón 3T3-L1. Por ejemplo, los análogos y derivados de FGF21 pueden analizarse por su capacidad de aumentar la captación de glucosa en los adipocitos. Los adipocitos 3T3-L1 diferenciados expresan endógenamente FGFR1c y BKL. Las células 3T3-L1 no responden al FGF21 hasta después de diferenciarse, la diferenciación conduce la expresión del correceptor BKL. La activación del complejo receptor FGFR1c/BKL aumenta la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1) y por lo tanto los análogos del FGF21 conducirán a una mayor cantidad de glucosa captada por los adipocitos de manera sensible a la dosis.

20 El valor de EC50 se usa comúnmente como una medida de la potencia de un fármaco. Se refiere a la concentración del compuesto en cuestión que induce una respuesta a mitad entre el valor basal y el máximo, con referencia a la curva de dosis-respuesta. De manera popular el EC50 representa la concentración donde se observa el 50 % del efecto máximo. La potencia in vitro de los derivados de la invención puede determinarse como se describió anteriormente y determinarse la EC50 del derivado en cuestión. A menor valor de EC50, mejor será la potencia.

25 A modo de ejemplo no limitante, el derivado de FGF21 de la invención tiene una potencia medida mediante el uso de las células HEK293 que sobreexpresan beta-kloto humano correspondiente a una EC50 al 0 % de HSA inferior a 60 nM, preferentemente inferior a 20 nM, o con mayor preferencia inferior a 10 nM (por ejemplo determinado como se describe en el Ejemplo 6).

30 A modo de ejemplo no limitante, el derivado de FGF21 de la invención tiene una potencia medida mediante el uso de la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 que corresponde a una EC50 inferior a 60 nM, preferentemente inferior a 20 nM, o con mayor preferencia inferior a 10 nM (por ejemplo determinado como se describe en el Ejemplo 7).

35 A modo de ejemplo no limitante, el derivado de FGF21 de la invención tiene una eficacia Emáx medida mediante el uso de la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de al menos 50 %, preferentemente al menos 80 %, o con mayor preferencia al menos 90 % (por ejemplo determinado como se describe en el Ejemplo 7).

40 A modo de ejemplo no limitante, el derivado de FGF21 de la invención tiene una potencia medida mediante el uso de la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 que corresponde a una EC50 inferior a 60 nM, preferentemente inferior a 20 nM, o con mayor preferencia inferior a 10 nM (por ejemplo determinado como se describe en el Ejemplo 7) y una eficacia de Emáx medida mediante el uso de la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de al menos 80 %, o más preferentemente al menos 90 % (por ejemplo determinado como se describe en el Ejemplo 7).

45 En una segunda modalidad particular, la potencia y/o la actividad se refieren a la potencia in vivo. Las proteínas y derivados de la invención son potentes in vivo, lo que puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como también en ensayos clínicos.

50 Se ha demostrado anteriormente que la pérdida de peso inducida por FGF21 en ratones delgados predice el efecto en ratones obesos y, por lo tanto, los ratones delgados se consideran un modelo de selección bueno. Los ratones delgados C57BL son un ejemplo de un modelo animal adecuado, y el efecto de disminución del peso corporal puede determinarse en tales ratones in vivo (determinados, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 9).

55 De acuerdo con un segundo aspecto, los derivados de la invención se prolongan. La prolongación puede estimarse in vitro, y/o determinarse a partir de estudios farmacocinéticos in vivo. Un aumento de la potencia in vitro, valor de EC50, 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. La prolongación puede determinarse, por ejemplo, como vida media terminal ($t_{1/2}$) después de la administración i.v. a, por ejemplo, ratones o minicerdos.

60

Como un ejemplo no limitante, el derivado de la invención tiene una vida media terminal después de la administración i.v. a ratones de al menos 1 hora, con mayor preferencia al menos 3 horas, o con la máxima preferencia al menos 10 horas (determinada, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 8).

5 Como otro ejemplo no limitante, el derivado de la invención tiene una vida media terminal después de la administración i.v. a los minicerdos de al menos 2 horas, con mayor preferencia al menos 10 horas, incluso con mayor preferencia al menos 20 horas o con la máxima preferencia al menos 50 horas (determinada, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 8).

10 De acuerdo con un tercer aspecto, los derivados de la invención se prolongan y al mismo tiempo tienen una potencia muy buena. La combinación particular de buena potencia/unión y vida media larga puede ser muy conveniente.

De acuerdo con un cuarto aspecto, los derivados de la invención tienen buenas propiedades biofísicas. Estas propiedades incluyen pero no se limitan a estabilidad física y/o solubilidad. Estas y otras propiedades biofísicas pueden medirse mediante el uso de métodos estándar conocidos en la técnica de la química de proteínas. En una modalidad particular, estas propiedades se mejoran en comparación con el FGF21 humano maduro.

15 En la sección titulada "MODALIDADES PARTICULARES", antes de la sección experimental, se describen modalidades particulares adicionales de los derivados de la invención.

20 Producción y purificación del compuesto FGF21

La producción de proteínas, por ejemplo, FGF21, es bien conocida en la técnica. Los análogos de FGF21 pueden producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica la molécula y es capaz de expresar análogos de FGF21 en un medio de nutrientes adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del análogo de FGF21. Se pueden usar varios métodos recombinantes en la producción de FGF21 y sus análogos. Ejemplos de métodos que pueden usarse en la producción de FGF21 en microorganismos tales como, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* se describen, por ejemplo, en el documento núm. WO12010553.

30 Los ejemplos específicos de métodos para preparar varios derivados de la invención se incluyen en la parte experimental. En resumen, los análogos de FGF21 se derivan en el residuo de cisteína por alquilación. Las cadenas laterales reactivas de tiol, tales como las cadenas laterales preparadas con una haloacetamida, pueden por lo tanto hacerse reaccionar con el análogo de FGF21. El análogo de FGF puede prepararse con una cisteamina que protege el grupo tiol de la cisteína. Si es así, el análogo se reduce con, por ejemplo, un agente reductor tal como una fosfina antes de reaccionar el análogo con la cadena lateral reactiva de tiol.

40 Los análogos y derivados de FGF21 de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromato enfoque, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativa (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación por sulfato de amonio) o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

45 Modo de administración

El término "tratamiento" pretende incluir tanto la prevención como la minimización de la enfermedad, trastorno o afección a los que se hace referencia (es decir, "tratamiento" se refiere tanto a la administración profiláctica como terapéutica de los derivados de FGF21 de la invención o de una composición que comprende los derivados de FGF21 de la invención) a menos que se indique de cualquier otra manera o se contradiga claramente por el contexto.

50 La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente un compuesto de esta invención al lugar deseado o adecuado en el cuerpo, tal como parenteral, por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Alternativamente, un compuesto de esta invención puede administrarse por vía oral, pulmonar, rectal, transdérmica, bucal, sublingual, o nasal.

Composiciones farmacéuticas

60 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de la invención o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptables de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede prepararse como se conoce en la técnica.

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

65

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

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

10 Las composiciones inyectables que comprenden compuestos de FGF21 de la presente invención pueden prepararse con el uso de técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según convenga para proporcionar el producto final deseado. Por lo tanto, de acuerdo con un procedimiento, un compuesto de FGF21 de esta invención se disuelve en un tampón adecuado a un pH adecuado de modo que la precipitación sea mínima o se evite. La composición inyectable se esteriliza, por ejemplo, mediante filtración estéril. También se pueden agregar agentes antimicrobianos a la composición.

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

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

30 El término "estabilidad química" se refiere a cambios químicos (en particular covalentes) de enlaces covalentes en la estructura de la proteína que conduce a la formación de productos de degradación química que tienen potencialmente una potencia biológica reducida, y/o efecto inmunogénico aumentado en comparación con la proteína intacta. 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, RP-HPLC, LCMS y/o mapeo peptídico.

35 En un aspecto, la invención proporciona derivados de FGF21 con estabilidad física mejorada. En un aspecto, la invención proporciona derivados de FGF21 con estabilidad química mejorada.

40 Tratamiento de combinación

El tratamiento con un derivado de FGF21 de acuerdo con la presente invención puede combinarse, además, con una más sustancias activas farmacológicamente adicionales, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes o asociados con la obesidad.

Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: agonistas del receptor de GLP-1, insulina, inhibidores de DPP-IV (peptidasa-IV), agonistas de amilina y agonistas del receptor de leptinas.

50 Indicaciones farmacéuticas

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

55 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;
- 60 (ii) retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión en la diabetes tipo 2, retardo de la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardo o prevención de la resistencia a la insulina, y/o retardo de 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 β , tal como disminuir la apoptosis de las células β , aumentar la función de las células β y/o la masa de células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β ;

(iv) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como la obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, aumento del gasto energético, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratamiento o prevención del trastorno por atracón, bulimia nerviosa, y/u obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; y/o prevención y/o tratamiento de comorbilidades de la obesidad, tales como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;

(v) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, como nefropatía;

(vi) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o tratamiento de la dislipidemia, reducción de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; reducción de LDL densa y pequeña; reducción de VLDL; reducción de triglicéridos; reducción del colesterol; reducción 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;

(vii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como el síndrome X, aterosclerosis, infarto de 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 ocluyente), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica;

(viii) prevención y/o tratamiento de la esteatosis hepática y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD); y/o

(ix) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía por enfermedad crítica (CIPNP), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención del desarrollo de enfermedades críticas o 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.

En una modalidad particular la indicación se selecciona del grupo que consiste en (i)-(vii). En otra modalidad particular, la indicación se selecciona del grupo que consiste en (i), (iv), (vi) y/o (vii). Se prefieren particularmente las siguientes indicaciones: Diabetes tipo 2 y/u obesidad. En una modalidad los compuestos de la invención son para el tratamiento de la diabetes tipo 2. En una modalidad los compuestos de la invención son para el tratamiento de la obesidad.

Modalidades particulares

Las siguientes son modalidades particulares de la invención:

1. Un derivado de una proteína FGF21,

en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1)

en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador;

en donde el prolongador se selecciona del grupo de

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

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

y

Químico 1C: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}^*$

en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18; y

en donde el enlazador comprende al menos uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:

en donde el Químico 2 se selecciona de:

$^*-\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}^*$,

$^*-\text{NH-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}^*$

y

$^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{ciclohexano}-\text{CO}^*$,

ES 2 742 503 T3

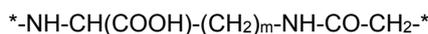
en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5,

en donde el Químico 3 es $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-^*$, 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, y

en donde el Químico 4 se selecciona de:



y



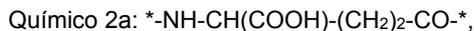
en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5; y

en donde el Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $^*-\text{NH}$ al extremo $\text{CO}-^*$ del prolongador, y en su extremo CH_2-^* al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

2. El derivado de acuerdo con la modalidad 1, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en la posición 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o la posición 181.

3. El derivado de acuerdo con la modalidad 1, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en la posición 170, 173, 174, 175, 180 o la posición 181.

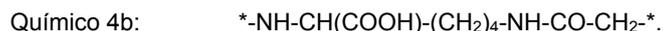
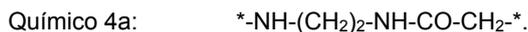
4. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 2 se selecciona del grupo de:



y



5. El derivado de acuerdo con la modalidad 1, en donde el Químico 4 se selecciona de:



6. Un derivado de una proteína FGF21, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), y un máximo de 30 modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1);

en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador;

en donde el prolongador se selecciona del grupo de

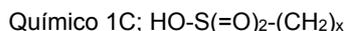


en donde x es un número entero en el intervalo de 10-18,



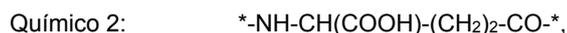
en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18,

y



en donde x es un número entero en el intervalo de 10-18,

en donde el enlazador comprende al menos uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:



Químico 3: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-^*$,
y

5 Químico 4: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$,

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; y m es un número entero en el intervalo de 1-5;

y

10 en donde el Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $^*-\text{NH}$ al extremo $\text{CO}-^*$ del prolongador, y en su extremo $-\text{CH}_2-^*$ al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

15 7. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 1 se selecciona del grupo de:

20 Químico 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-^*$,

Químico 1b: $\text{HOOC-benceno-O}-(\text{CH}_2)_9-\text{CO}-^*$

y

25 Químico 1c: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-^*$

8. Un derivado de una proteína FGF21,

en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador;

30 en donde el prolongador es el

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

en donde x es un número entero en el intervalo de 10-18; y

en donde el enlazador comprende al menos uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:

40 Químico 2: $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$,

Químico 3: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-^*$,

y

45 Químico 4: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$,

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; y m es un número entero en el intervalo de 1-5;

50 en donde el Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $^*-\text{NH}$ al extremo $\text{CO}-^*$ del prolongador, y en su extremo CH_2-^* al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

55 9. Un derivado de una proteína FGF21,

en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), y un máximo de 30 modificaciones de aminoácidos en comparación con FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1);

60 en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador;

en donde el prolongador es el

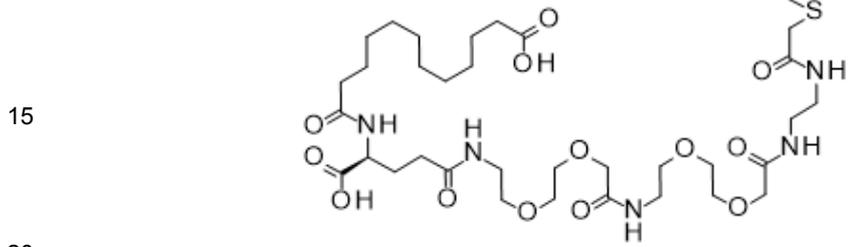
65 Químico 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

25. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Químico 1 es 1B y x es un número entero en el intervalo de 8-12.
- 5 26. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde x es 16.
27. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde k es un número entero en el intervalo de 1-2.
- 10 28. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde k es 1.
29. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde n es un número entero en el intervalo de 1-2.
- 15 30. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde n es 1.
31. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde m del Químico 4 es un número entero en el intervalo de 1-5.
- 20 32. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde m del Químico 4 es 2.
33. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el prolongador comprende el
- Químico 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}^*$.
- 25 34. El derivado de acuerdo con cualquier modalidad anterior, en donde el prolongador consiste en el Químico 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}^*$.
- 35 35. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador comprende el Químico 3a: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}^*$.
- 30 36. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador comprende el Químico 4a: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2^*$.
- 35 37. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en al menos un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3, y un elemento del Químico 4.
38. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3, y un elemento del Químico 4.
- 40 39. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en dos elementos del Químico 2, dos elementos del Químico 3, y un elemento del Químico 4.
- 45 40. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador consiste en un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3a, y un elemento del Químico 4a.
41. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es uno de los siguientes:
- 50 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 13)

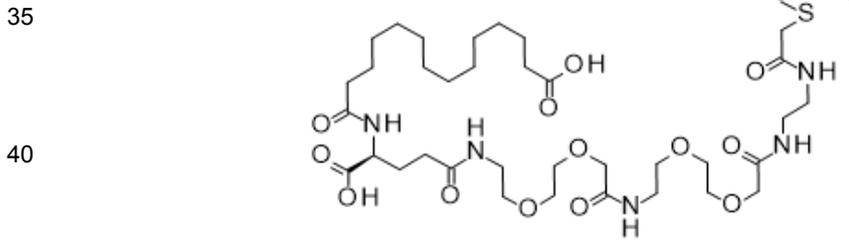
55

60

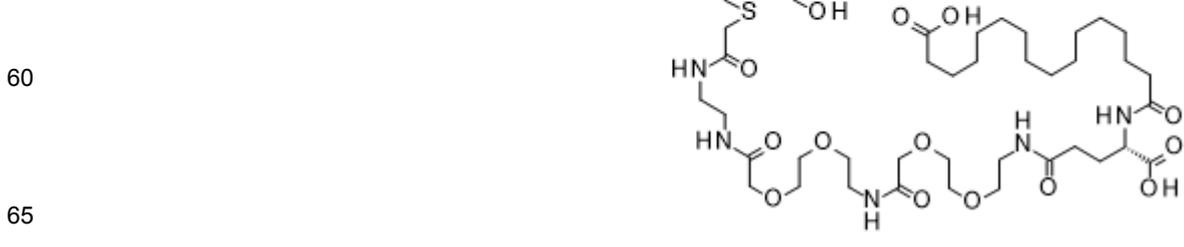
65



20 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-
 Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 14)



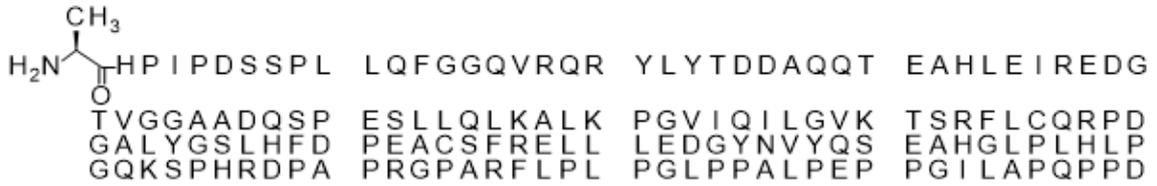
40 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-
 Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 15)



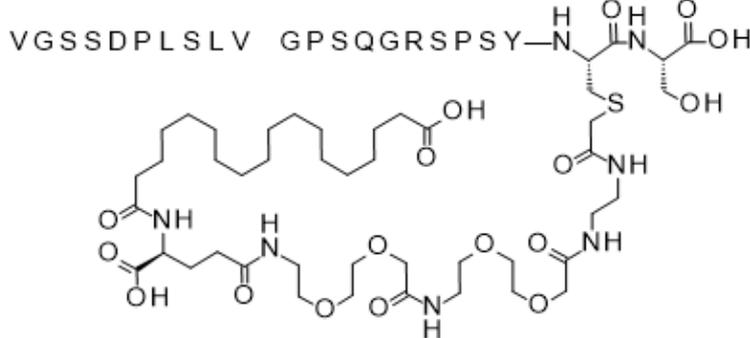
65

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 16)

5



10



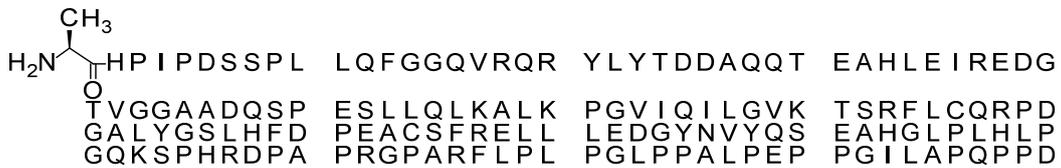
15

20

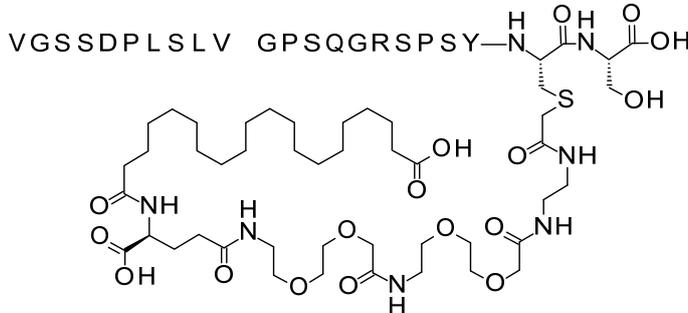
25

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 17)

30



35



40

45

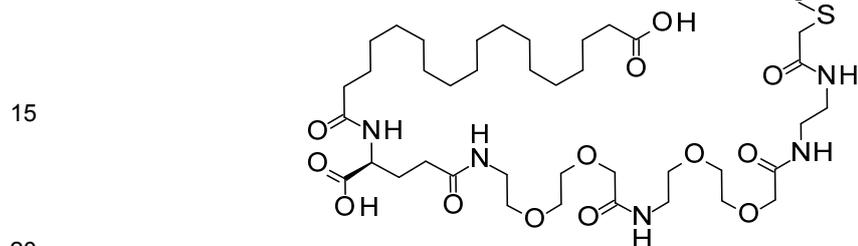
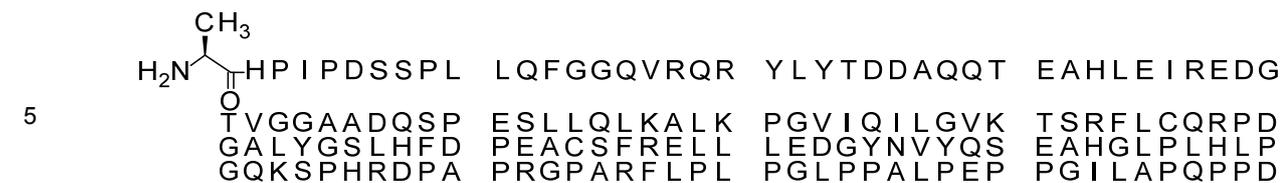
50

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (Compuesto 18)

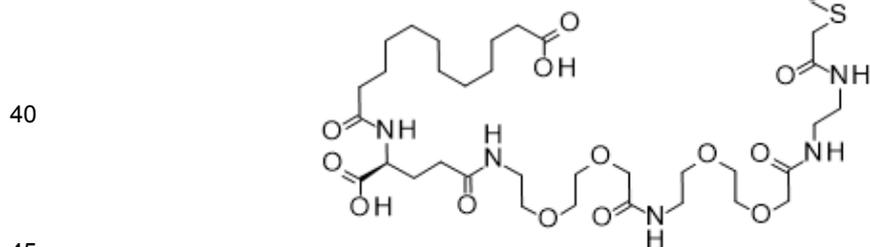
55

60

65



25 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 19)

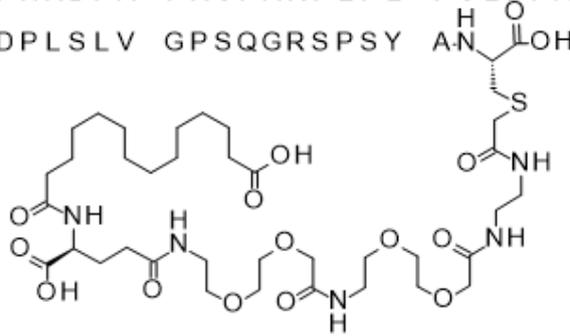


50 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 20)

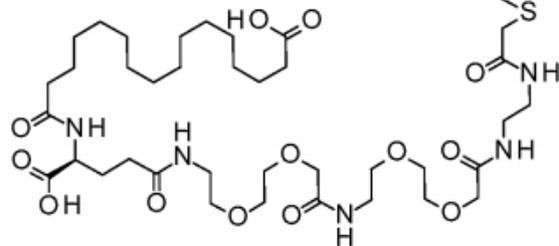
55

60

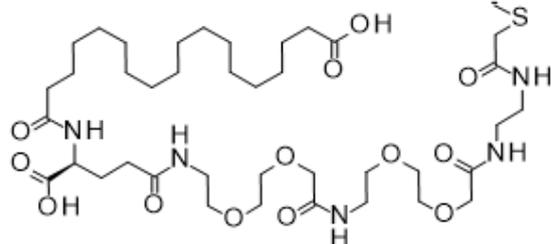
65



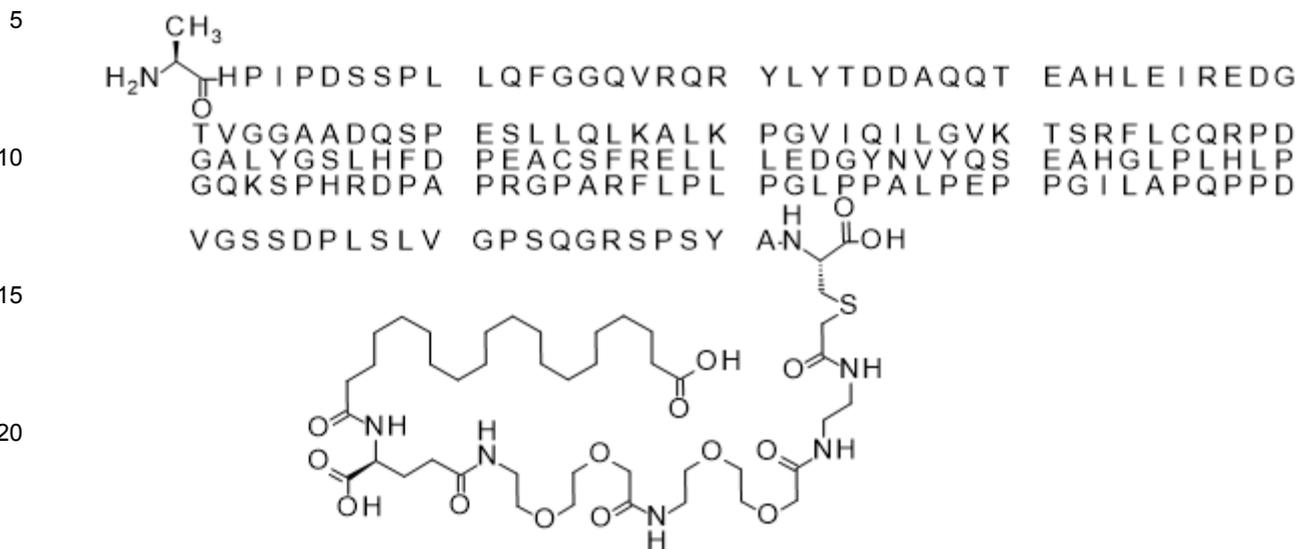
S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 21)



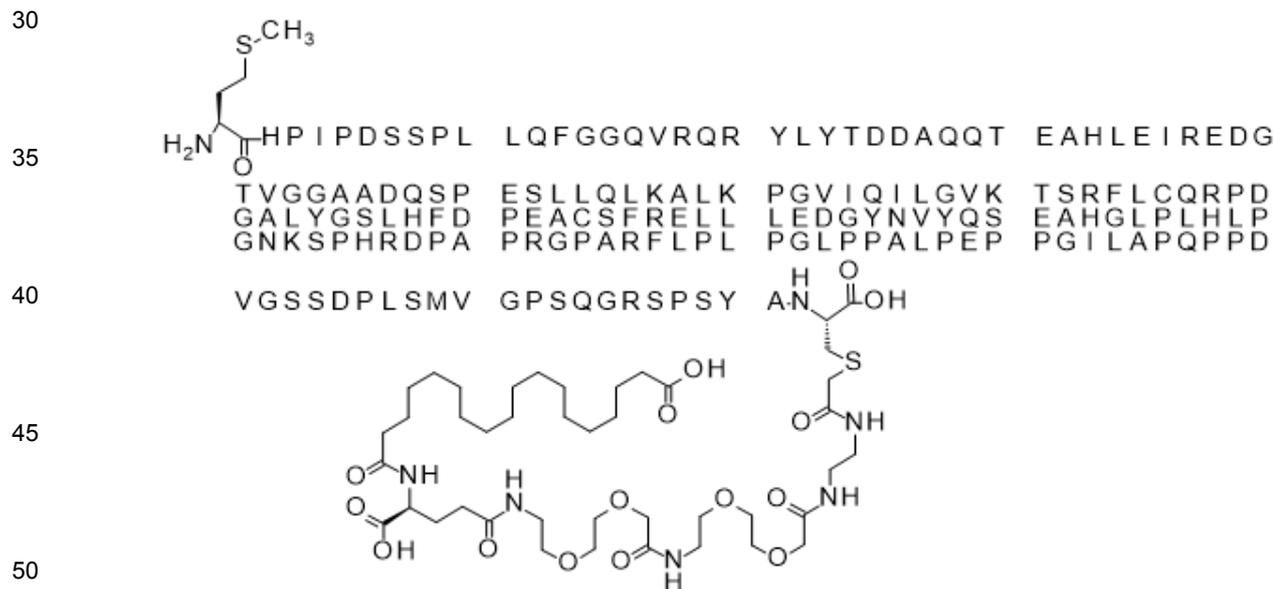
S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 22)



S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 23)



S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Met[Cys181]FGF21 (Compuesto 24)

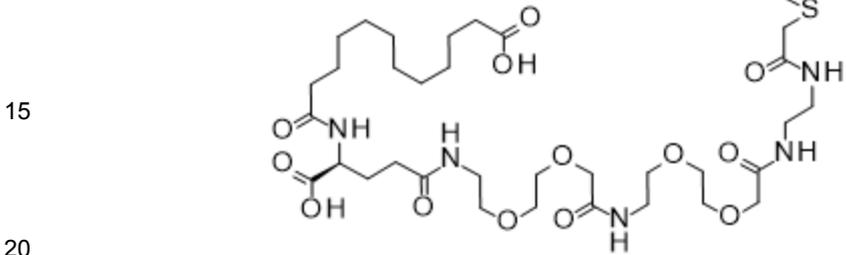


42. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es uno de los siguientes:

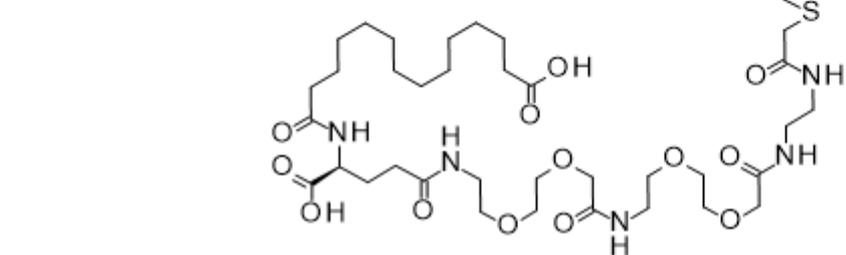
55 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 13)

60

65

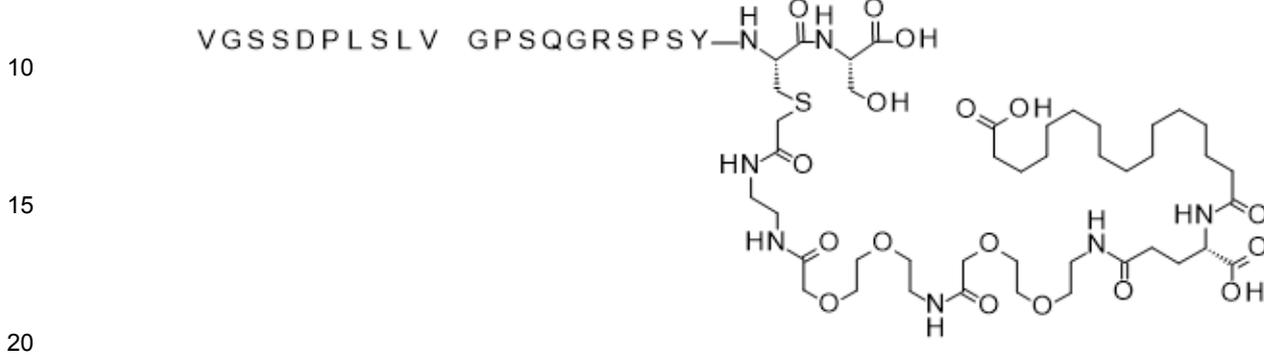


25 S(Beta-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 14)



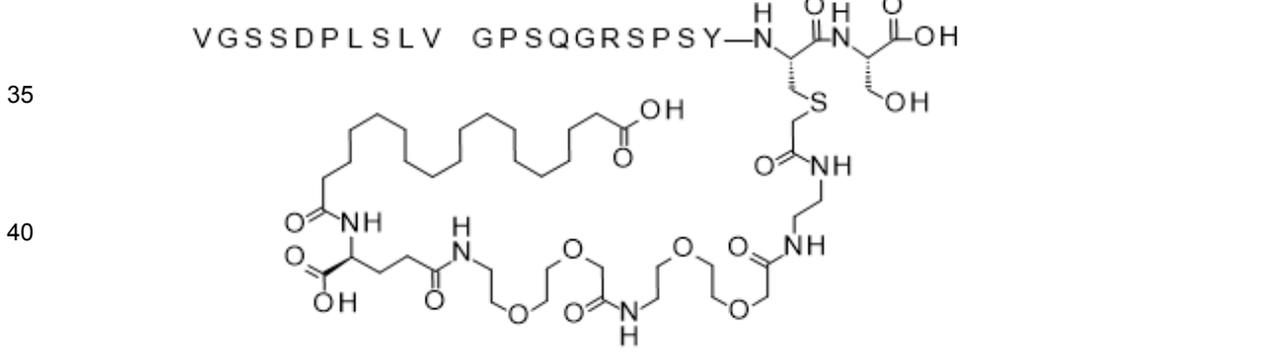
30 S(Beta-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 15)

5 H₂N-CH(CH₃)-C(=O)-HP I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD



S(Beta-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 16)

25 H₂N-CH(CH₃)-C(=O)-HP I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
 30 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD



S(Beta-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 17)

50
55
60
65

ES 2 742 503 T3

50. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
18.
- 5 51. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
19.
52. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
20.
- 10 53. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
21.
54. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
22.
- 15 55. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
23.
- 20 56. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
24.
57. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
35.
- 25 58. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
36.
59. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
37.
- 30 60. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
38.
61. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
39.
- 35 62. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
40.
63. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
41.
- 40 64. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
43.
- 45 65. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
44.
66. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
45.
- 50 67. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
46.
68. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
47.
- 55 69. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
48.
- 60 70. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
49.
71. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
50.
- 65 72. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto
51.

73. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto 53.
- 5 74. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto 54.
75. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto 55.
- 10 76. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es el Compuesto 56.
- 15 77. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado tiene actividad de FGF21
78. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el derivado es capaz de activar receptores de FGF.
- 20 79. El derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la vida media terminal ($t_{1/2}$) después de la administración i.v. a los minicerdos es al menos 20 veces mayor que la vida media terminal ($t_{1/2}$) del FGF21 humano maduro.
80. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-79 para usar como un medicamento.
- 25 81. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-79, para usar en un método para el tratamiento y/o la prevención de cualquiera de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como obesidad, trastornos alimentarios, enfermedades cardiovasculares complicaciones diabéticas, y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células β ; y/o para retardar o prevenir la progresión de una enfermedad diabética; y/o para el tratamiento y/o la prevención de esteatosis hepática y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 30 82. Uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-79, en la fabricación de en un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como obesidad, trastornos alimentarios, enfermedades cardiovasculares complicaciones diabéticas, y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células β ; y/o para retardar o prevenir la progresión de una enfermedad diabética; y/o para el tratamiento y/o la prevención de esteatosis hepática y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 35 83. Un método para el tratar o prevenir todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como obesidad, trastornos alimentarios, enfermedades cardiovasculares complicaciones diabéticas, y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células β ; y/o para retardar o prevenir la progresión de una enfermedad diabética; y/o para el tratamiento y/o la prevención de esteatosis hepática y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) mediante la administración de una cantidad activa farmacéuticamente de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-79.
- 40 84. Una proteína FGF21 que comprende una sustitución de aminoácidos de un aminoácido de tipo silvestre por un residuo de cisteína en una posición correspondiente a uno de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).
- 45 85. La proteína FGF21 de acuerdo con la modalidad 83, en donde la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a una de las posiciones 170, 173, 174, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).
- 50 86. La proteína FGF21 de acuerdo con la modalidad 83, en donde la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a uno de las posiciones 170, 173 y 174 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).
- 55 87. La proteína FGF21 de acuerdo con la modalidad 83, en donde la proteína FGF21 comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a uno de las posiciones 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).
88. La proteína FGF21 de acuerdo con la modalidad 83 en donde la proteína FGF21 comprende -1Ala, 121Gln y/o 168Leu en adición a un residuo variante de Cys.
- 60 89. La proteína FGF21 de acuerdo con la modalidad 83 en donde la proteína FGF21 comprende -1Ala, 121Gln y/o 168Leu en adición a una cisteína en una de las posiciones 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 y 181 de FGF21 (1-181) (SEQ ID NO:1).

65 **EJEMPLOS**

Lista de abreviaturas

- AcOD: acetona deuterada
- 5 Ado: ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico
- BSPP: Bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidrato de sal de dipotasio
- DCM: diclorometano
- 10 DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPBS: Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
- 15 EDAC: (3-dimetilaminopropil) etil carbodiimida
- ELSD: Detector de Dispersión de Luz de Evaporación
- Fmoc: 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
- 20 Fc: Fragmento, cristalizable
- GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1
- 25 gGlu: ácido gamma glutámico
- GLUT1: transportador de glucosa 1
- HATU: hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
- 30 HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
- HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento
- 35 IgG4: Inmunoglobulina G4
- IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
- IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopirananósido
- 40 LCMS: Cromatografía líquida Espectroscopía de masas
- Mtt: 4-metiltrilito
- 45 NMR: Resonancia Magnética Nuclear
- OtBu: éster terc butílico
- PBS: solución salina tamponada con fosfato
- 50 RF: factor de retardo
- Rt = tiempo de retención
- 55 RT: temperatura ambiente
- tBu: t-butil
- TCTU: tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- 60 TFA: ácido trifluoroacético
- Tris: tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
- 65 Trx: ácido tranexámico

UPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento

ZOSu: N-(benciloxicarbonilo)succinimida

5 Materiales y Métodos

Métodos generales de detección y caracterización

Método de LCMS 1

10 La muestra se diluye a aproximadamente 0,2 mg/ml y se inyecta en un sistema LCMS, por ejemplo, 3-5 ul. El instrumento LCMS consiste en un sistema UPLC y un espectrómetro de masas. Los análogos se desalan y pueden separarse en una columna de fase inversa (por ejemplo, una columna o precolumna C4, C8, C18) y se analizan mediante el uso de un gradiente lineal de acetonitrilo en TFA al 0,02-0,05 % (ácido trifluoroacético). El instrumento debe calibrarse y, si es posible, mediante el uso de pulverización con masa de estándar. El espectro de MS sobre el pico cromatográfico principal se genera y la masa intacta se reconstruye mediante el uso de un algoritmo de deconvolución.

20 Ejemplo de los ajustes del instrumento LCMS (Synapt):

modo de ion positivo

potencial capilar de 3000 V,

25 voltaje de cono 30V

temperatura de la fuente 110 °C,

30 temperatura de desolvatación 250 °C

flujo de gas del cono (N2) de 25L/h.

intervalo m/z 200-3000

35 Se proporciona la masa deconvolucionada

Método de LCMS 2

40 Sistema: Columna UPLC serie infinity Agilent 1290 Aeris WISPORE 3,6µ XB-C18 2,1 x 50 mm Detector: Agilent Technologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A) Configuración del detector del método de ionización: Fuente Agilent Jet Stream Intervalo de barrido: m/z min. 100, m/z máx. 3200 modo reflector lineal modo positivo

45 Condiciones: Gradiente lineal: 5 % a 95 % de B tiempo de corrida del gradiente: 10 minutos 0-8 min 5-95 % de B, 8-9 min 95 % de B, 9-9,5 min 95-5 % de B 9,5-10 min 5 % de B velocidad de flujo: 0,40 ml/min temperatura de la columna fija: 40 °C

Eluyentes Solvente A: 99,90 % de H2O, 0,02 % de Solvente B de TFA: 99,90 % de CH3CN, 0,02 % Solvente C de TFA: NA

50 Descripción y validación de los resultados: La masa encontrada es ya sea m/z ((m+z)/z) del compuesto para los compuestos con m<4000 o masa (promedio) como el resultado de una deconvolución mediante el uso del programa informático Masshunter Workstation versión B.05.00 Build 5.0.519.13 SP1 (Agilent). La masa calculada es el peso molecular promedio del compuesto deseado. M / z calculado es el peso molecular (m + z) / z del compuesto deseado.

55 Método de LCMS 3

Sistema: Columna UPLC serie infinity Agilent 1290 Phenomenex Aeris ancho del poro 3,6 µ C4 50x2,1 mm Detector: Agilent Technologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A)

60 Método de ionización de la configuración del detector: Fuente Agilent Jet Stream Intervalo de barrido: m/z min. 100, m/z máx. 3200 modo reflector lineal modo positivo

65 Condiciones: Gradiente de etapa: 5 % a 90 % de B tiempo de corrida del gradiente: 10 minutos: 0-1 min 5-20 % de B, 1-7 min 20-90 % de B, 7-8 min 90 % de B 8-8,5 min 90-5 % de B 8,5-10 min 5 % de B velocidad de flujo: 0,40 ml/min temperatura de la columna fija: 40 °C

Eluyentes Solvente A: 99,90 % de H₂O, 0,02 % de Solvente B de TFA: 99,90 % de CH₃CN, 0,02 % Solvente C de TFA: NA

5 Descripción y validación de los resultados: La masa encontrada es ya sea m/z ((m+z)/z) del compuesto para los compuestos con m<4000 o masa (promedio) como el resultado de una deconvolución mediante el uso del programa informático Masshunter Workstation versión B.05.00 Build 5.0.519.13 SP1 (Agilent). La masa calculada es el peso molecular promedio del compuesto deseado. M / z calculado es el peso molecular (m + z) / z del compuesto deseado.

10 Método de LCMS 4

Sistema: Sistema de autopurificación Waters

Columna: Kinetex C18 4,6 mm x 50 mm

15 Detector: UV: PDA, ELSD, MS Micromass Quatro micro

Configuración del detector: Método de ionización: ES+ , intervalo de barrido 100-1000, Cono 30 V, Capilar 300 kV, tiempo de barrido 1,3 s; PDA: 210-400 nm; ELSD: Nebulizador calentador-enfriador 70 %, tubo de empuje 57,0 °C

20 Condiciones: Gradiente lineal de acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + 0,1 % de FA, tiempo de corrida del gradiente: 4,0 min, tiempo de corrida total: 6,0 min, velocidad de flujo: 1,1 ml/min, temperatura de la columna: 23 °C

Preparación de los compuestos de la invención

25 Ejemplo 1: Clonación y expresión de FGF21 humano maduro

El ADN y las secuencias de aminoácidos para el FGF21 humano se ha descrito, por ejemplo, por Nishimura y otros en *Biochim. Biophys. Acta* 1492(1):203-206 (2000). Las secuencias están disponibles, además, desde las bases de datos públicas con núms. de acceso EMBL:AB021975 y UNIPROT:Q9NSA1, respectivamente.

30 La proteína humana madura FGF21 se clonó y se expresó como una proteína intracelular en *E. coli*, sin el péptido señal, pero con una metionina añadida en el N-terminal. Más en particular, la secuencia génica que codifica para el FGF21 humano maduro (con una Met añadida en el N terminal) se optimizó con codones para la expresión en *E.coli* y se clonó entre el sitio NdeI y BamHI del vector pET11c. Esto pone el gen de FGF21 bajo el control del promotor T7 de fago. El constructo de expresión se transformó en *E. coli* BL21(DE3). Se recogió una sola colonia y se cultivó en LB + Amp 100 ug/ml a OD₄₅₀ de 0,5. La expresión se indujo con IPTG 0,3 mM durante 4 horas a 37° C. Los extractos crudos de las células se realizaron mediante sonicación para el análisis de la expresión de FGF21. Un SDS-PAGE teñido con Coomassie demostró la expresión exitosa del FGF21 que se identificó principalmente en la fracción del sobrenadante. Aunque la MW calculada del Met-FGF21 así expresado es 19,5 kD, este migra en el gel como una
35 40 proteína de 25 kD, lo que se debe, probablemente, al alto contenido en prolinas, que retardan el movimiento de la proteína.

45 En la presente solicitud, MetFGF21 se usa como el compuesto de referencia. Cuando FGF21 se produce mediante el uso de sistemas de expresión en *E. Coli*, se introduce una metionina en el N-terminal del FGF21. Sin embargo, esto no se considera que afecta la actividad biológica, y tanto FGF21 como MetFGF21 se usan comúnmente por lo tanto como compuestos de referencia.

Ejemplo 2: Clonación y expresión de los análogos del FGF21

50 Los constructos de expresión para los análogos en la tabla 1 (ejemplo 3) se realizaron por mutagénesis sobre el constructo de expresión de FGF21 maduro descrito en el ejemplo 1. Se usó un kit de mutagénesis en múltiples sitios de Stratagene. Se aplicó además la misma condición de expresión como se describió en el ejemplo 1. Un SDS-PAGE teñida con azul coomassie mostró la expresión exitosa de los análogos. Los análogos se expresaron incluyendo el dipéptido Met-Ala N-terminal a las secuencias FGF21 lo que permite la expresión de un análogo de FGF21 con Ala como el residuo de amino ácido N-terminal debido a la escisión de la Met por las enzimas de *E. coli*.

Ejemplo 3: Purificación de FGF21 maduro y los análogos de FGF21

60 Para purificar los análogos de FGF21 y FGF21 maduros descritos en los Ejemplos 1-2, se usó el siguiente proceso o técnicas similares:

El sedimento celular de *E. coli* se resuspendió en 10 mM de fosfato de potasio pH 6,0, y se desintegró por un homogeneizador a 800 bar dos veces. Los cuerpos de inclusión se sedimentaron por centrifugación (10 000 x g, durante 30 minutos), se resolubilizaron en Tris 50 mM a pH 8,0, y se añadieron opcionalmente urea 2M y/o cisteína 5 mM, y la suspensión se agitó durante la noche a 4°C. Antes de la aplicación en la columna, la suspensión se centrifugó nuevamente a 10 000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se aplicó a una cromatografía de intercambio aniónico

(resina Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) y se eluyó con 50-250 mM de NaCl. Se añadió sulfato de amonio 0,4 M al grupo de elución, que luego se aplicó a una columna de Phenil FF (GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM pH 8,0, sulfato de amonio 0,4 M. La columna se lavó con Tris 20 mM pH 8,0, cloruro de sodio 1,5 M antes de la elución con tampón Tris-cloruro al 10 % (Tris 20 mM pH 8,0, cloruro de sodio 1,5 M). Una columna 30Q puede usarse para pulido de pureza adicional. El producto final se analizó mediante SDS-PAGE u otras técnicas relevantes. Para los compuestos 3 y 5-10, la protección de cisteamina de las cisteínas introducidas se conservó durante la prueba farmacológica.

Los análogos de FGF21 se prepararon como se describió anteriormente. La masa intacta determinada por LCMS (mediante el uso del método de LCMS 1) se proporcionan para los compuestos.

Tabla 1A. Análogos de FGF21 del 1 al 10.

Compuesto	Nombre del Compuesto	SEQ ID NO de la cadena principal de la proteína	Peso molecular	Masa intacta de LCMS (promedio) (Da)
1	MetFGF21	2	19540,0	19540,5
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	3	19475,9	19476,4
3	S{Beta-176}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	4	19567,1	19567,0
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	5	19481,9	19481,6
5	S{Beta-178}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	6	19567,1	19568,0
6	S{Beta-179}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	7	19491,0	19492,0
7	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	8	19583,1	19583,96
8	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21	9	19496,0	19496,1
9	S{Beta-181}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	10	19567,1	19567,8
10	S{Beta-181}-2-aminoetilsulfanil-Met[Cys181]FGF21	11	19631,0	19630,6

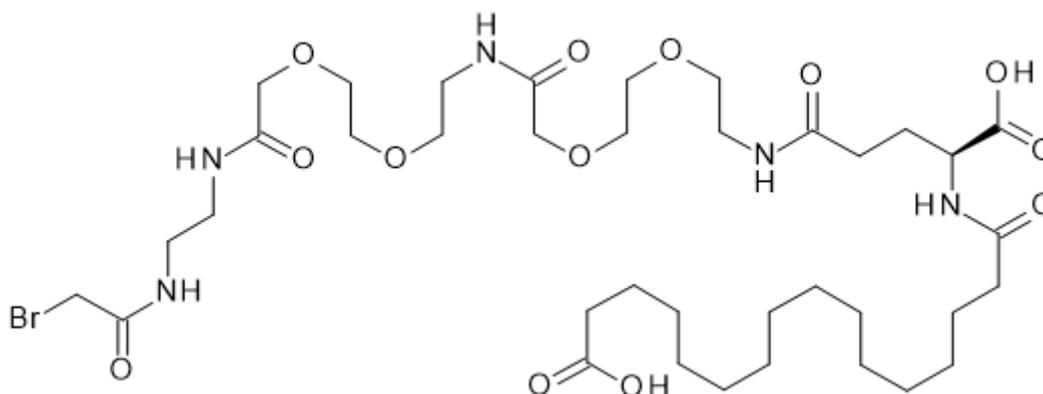
Tabla 1B. Análogos de FGF21 del 25 al 32

Compuesto	Nombre del Compuesto	SEQ ID NO de la cadena principal de la proteína	Peso molecular	Masa intacta de LCMS (promedio) (Da)
25	-1A, 121Q, 167C, 168L	12	19491,9	19491,7
26	-1A, 121Q, 168C	13	19465,9	19466,2
27	-1A, 121Q, 168L, 169C	14	19479,9	19479,7
28	-1A, 121Q, 168L, 170C	15	19522,0	19521,9
29	-1A, 121Q, 168L, 172C	17	19491,9	19492,0
30	-1A, 121Q, 168L, 173C	18	19450,9	19450,5
31	-1A, 121Q, 168L, 174C	19	19522,0	19522,1
32	-1A, 121Q, 168L, 175C	20	19422,8	19422,4

Ejemplo 4: Preparación de reactivos para la derivatización de los análogos de FGF21

La preparación de un reactivo representativo para la derivatización se proporciona en el Ejemplo 4.1. Los reactivos de los Ejemplos 4.2-4.4 se preparan mediante el método proporcionado en el Ejemplo 4.1. Los reactivos de los ejemplos 4.5-4.17 se prepararon mediante métodos similares como se describe a continuación.

Ejemplo 4.1: Preparación del ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-((2-(2-((2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]pentadecanoico



Protocolo Sintético en Fase Sólida:

Una solución de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida (ZOSu, 100 g, 401 mmol) en diclorometano (500 ml) se añadió en forma de gotas durante 2 horas a una solución de etilendiamina (1, 189 ml, 2,81 mol) en diclorometano (750 ml). Después de 30 minutos la suspensión se filtró y los sólidos se lavaron con diclorometano. El filtrado se evaporó hasta la sequedad y el residuo se diluyó con tolueno (1,00 L) y agua (0,50 L). La mezcla resultante se filtró y el filtrado se separó para proporcionar dos fases. La fase acuosa contenía el producto; por lo tanto se extrajo con diclorometano (2 x 250 ml). Todas las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se diluyó con tolueno (750 ml) y se extrajo con ácido clorhídrico acuoso 2 M (500 ml) y ácido clorhídrico acuoso 1 M (100 ml). Las fases acuosas ácidas se combinaron y se basificaron con una solución de hidróxido de sodio (60,0 g, 1,50 mol) en agua (90 ml). La mezcla resultante se extrajo con diclorometano (4 x 200 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró al vacío y se diluyó con hexanos (200 ml). Se añadió 4 M de solución de cloruro de hidrógeno en éter (100 ml, 400 mmol) a la solución, la suspensión resultante se concentró al vacío y se diluyó con hexanos (1,00 L). El sólido precipitado se filtró, se lavó con hexanos y se secó al vacío para dar hidrocloreto ácido (2-amino-etil)-carbámico bencil éster como polvo blanco.

Rendimiento: 62,62 g (68 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 4:1): 0,25 (sin base).

Espectro de ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, 80 °C, dH): 7,42-7,26 (m, 5 H); 5,16 (s, 2 H); 3,60 (t, J=5,7 Hz, 2 H); 3,32 (t, J=5,7 Hz, 2 H).

La resina de 2-clorotritilo malla de 100-200 1,7 mmol/g (3, 40,1 g, 68,1 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (250 ml) durante 20 minutos. Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 17,5 g, 45,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (30,1 ml, 173 mmol) en diclorometano seco (50 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 5 horas. La resina se filtró y trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (15,8 ml, 90,8 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 250 ml, 2 x 5 min). Luego la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 26,3 g, 68,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24,2 g, 68,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21,4 ml, 123 mmol) en N,N-dimetilformamida (140 ml) a resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Se añadió solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-entanodioico (Fmoc-Glu-OtBu, 29,0 g, 68,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24,2 g, 68,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21,4 mL, 123 mmol) en N,N-dimetilformamida (140 mL) a resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Se añadió una solución de ácido 16-(terc-butoxi)-16-oxohexadecanoico (23,3 g, 68,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24,2 g, 68,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21,4 ml, 123 mmol) en mezcla de N,N-dimetilformamida/diclorometano (4:1, 200 ml) a resina. La resina se agitó durante 1 hora, se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml), metanol (2 x 250 ml) y diclorometano (350, 6 x 250 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 2,2,2-trifluoetanol (250 ml) durante 18 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (2 x 250 ml), mezcla de 2-propanol/diclorometano (1:1, 2 x 250 ml), 2-propanol (250 ml) y diclorometano (3 x 250 ml). Las soluciones se combinaron; el disolvente se

evaporó y el producto crudo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 1:0-9:1). El ácido puro de (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico se secó al vacío y se obtuvo como aceite amarillo espeso amarillo pálido.

- 5 Rendimiento: 30,88 g (83 %).
- RF (SiO₂, diclorometano/metanol 4:1): 0,30.
- 10 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,36 (t, J=5,7 Hz, 1 H); 7,02 (t, J=5,4 Hz, 1 H); 6,55 (d, J=7,7 Hz, 1 H); 4,46 (m, 1 H); 4,18 (s, 2 H); 4,02 (s, 2 H); 3,83-3,36 (m, 16 H); 2,44-2,12 (m, 7 H); 2,02-1,86 (m, 1 H); 1,60 (m, 4 H); 1,47 (s, 9 H); 1,45 (s, 9 H); 1,36-1,21 (m, 20 H).

Método de LC-MS 4:

- 15 Pureza: 100 %
- Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,60 min.
- 20 Encontrado m/z, z=1: 818,7 (M+H)⁺

Se añadieron posteriormente hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 11,4 g, 30,1 mmol) y trietilamina (8,77 ml, 62,9 mmol) a una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico (22,4 g, 27,4 mmol) en diclorometano seco (110 ml). Se añadió trietilamina (5,72 ml, 41,0 mmol) a una suspensión de hidrocloreto de ácido (2-amino-etil)-carbámico bencil éster (6,94 g, 30,1 mmol) en diclorometano seco (165 ml) y la mezcla resultante se añadió a la solución anterior. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (500 ml); se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (2 x 200 ml), 5 % de solución acuosa de carbonato de sodio (2 x 200 ml, separación de fases muy lenta), ácido clorhídrico acuoso 1 M (8 x 200 ml) y salmuera; se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta la sequedad al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar ácido 15-[(S)-3-(2-{2-[(2-benciloxicarbonilamino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi}-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-1-tert-butoxicarbonil-propilcarbamoil]-pentadecanoico terc-butil éster como aceite espeso amarillo pálido.

- 35 Rendimiento: 23,84 g (88 %).
- RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,35
- 40 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,39-7,26 (m, 6 H); 7,19 (t, J=6,3 Hz, 1 H); 6,91 (t, J=5,7 Hz, 1 H); 6,52 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 5,83 (t, J=5,5 Hz, 1 H); 5,09 (s, 2 H); 4,41 (ddd, J=12,3, 4,6 y 4,3 Hz, 1 H); 3,99 (s, 2 H); 3,97 (s, 2 H); 3,71-3,30 (m, 20 H); 2,33-2,08 (m, 7 H); 1,97-1,83 (m, 1 H); 1,67-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,35-1,20 (m, 20 H).

Método de LCMS 4

- Pureza: 100 %
- Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 4,18 min
- 50 Encontrado m/z, z=1: 994,9 (M+H)⁺

Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 1,27 g, 1,20 mmol) a una solución del compuesto anterior (23,8 g, 24,0 mmol) en metanol (350 ml) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 4 horas. El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se evaporó varias veces a partir de diclorometano para eliminar residuos de metanol y se secó al vacío para proporcionar terc-butil (S)-1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-4,13,22,27-tetraoxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21,26-tetraazadotetracontanoico-42-oato como aceite sin color espeso.

- 60 Rendimiento: 20,50 g (99 %).
- RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,05.
- Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,54 (t, J=5,7 Hz, 1 H); 7,41 (t, J=5,6 Hz, 1 H); 7,14 (t, J=5,5 Hz, 1 H); 6,68 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 5,25 (bs, 2 H); 4,39 (td, J=8,3 y 4,2 Hz, 1 H); 4,01 (s, 4 H); 3,74-3,39 (m, 18 H); 2,96 (t, J=5,7 Hz, 2 H); 2,34-2,06 (m, 7 H); 1,97-1,83 (m, 1 H); 1,68-1,50 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,43 (s, 9 H); 1,37-1,19 (m, 20 H).
- 65

Método de LCMS 4

Pureza: 100 %

5 Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 1,43 min

Encontrado m/z, z=1: 860,8 (M+H)+

10 Se añadió N,N-Diisopropiletilamina (4,98 ml, 28,6 mmol) a una solución de la amina anterior (6, 20,5 g, 23,8 mmol) en diclorometano seco (290 ml) a -30 °C bajo argón. Se añadió Bromuro de bromoacetilo (2,48 ml, 28,6 mmol) en forma de gotas y la solución resultante se agitó a -30 °C durante 3 horas adicionales. El baño de enfriamiento se eliminó, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego el solvente se eliminó al vacío. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (450 ml) y se lavó con solución acuosa al 5 % de ácido cítrico (300 ml). Las fases se separaron dentro de 1 hora. La capa orgánica se lavó con agua (300 ml) y la emulsión resultante se dejó separar durante la noche para dar 3 fases. La capa acuosa transparente se retiró y las 2 fases residuales se agitaron con solución acuosa saturada de bromuro de potasio (100 ml). Las fases se dejaron separar durante toda la noche, la acuosa se retiró después y la orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar terc-butyl (S)-1-bromo-28-(terc-butoxicarbonil)-2,7,16,25,30-pentaoxo-9,12,18,21-tetraoxa-3,6,15,24,29-pentaazapentatetracontan-45-oato como un sólido incoloro.

Rendimiento: 19,46 g (83 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,25

25 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,46 (m, 1 H); 7,33 (t, J=5,9 Hz, 1 H); 7,21 (t, J=5,1 Hz, 1 H); 6,92 (t, J=5,2 Hz, 1 H); 6,50 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 4,41 (ddd, J=12,2, 4,5 y 4,2 Hz, 1 H); 4,01 (s, 4 H), 3,85 (s, 2 H); 3,75-3,40 (m, 20 H), 2,36-2,08 (m, 7 H); 1,99-1,84 (m, 1 H); 1,68-1,51 (m, 4 H), 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,38-1,19 (m, 20 H)

30 Método de LCMS 4

Pureza: 100 %

35 Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,51 min.

Encontrado: m/z, z=1: 980,9, 982,9 (M+H)+

40 El compuesto anterior (19,5 g, 19,8 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (120 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El ácido trifluoroacético se eliminó al vacío y el residuo se evaporó del diclorometano (6 x 200 ml). Se añadió éter de dietilo (200 ml) al residuo oleoso y la mezcla se agitó durante toda la noche para dar una suspensión. El producto sólido se filtró, se lavó con éter de dietilo y hexanos y se secó al vacío para proporcionar el producto del título ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-((S)-1-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}pentadecanoico como un polvo blanco.

45 Rendimiento: 16,74 g (97 %).

50 Espectro de 1H NMR 300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4,61 (dd, J=8,8 y 4,8 Hz, 1 H); 4,12 (s, 2 H), 4,10 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,77 -3,39 (m, 20 H), 2,49-2,18 (m, 7 H); 2,16-1,04 (m, 1 H); 1,71-1,56 (m, 4 H), 1,30 (bs, 20 H)

Método de LCMS 4:

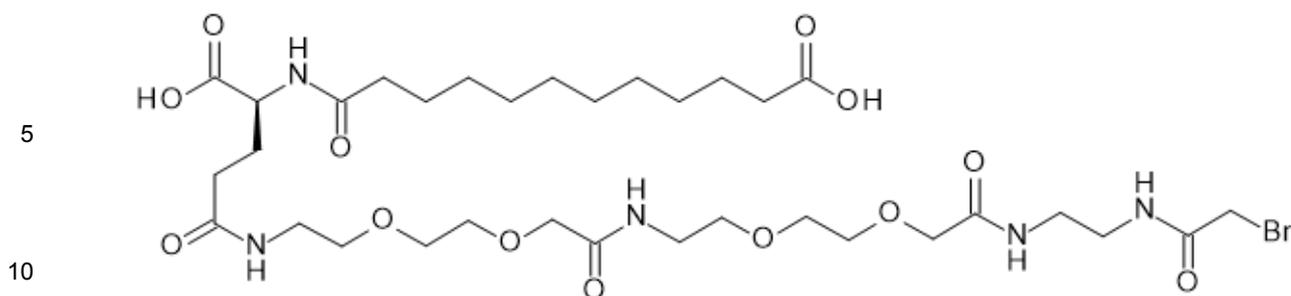
Pureza: 100 %

55 Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,51 min

m/z teórico, z=1: 869,8, encontrado: m/z, z=1: 868,7, 870,7

60 Ejemplo 4.2: Preparación del ácido 11-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-((S)-1-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}undecanoico

65



15 Se preparó ácido 11-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]undecanoico mediante el mismo método como se describió en el Ejemplo 4.1 que resulta en un aceite naranja espeso.

Espectro de 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,61 (dd, J=8,9 y 4,9 Hz, 1 H); 4,13 (s, 2 H); 4,10 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,79-3,38 (m, 20 H); 2,50-2,16 (m, 7 H); 2,16-2,00 (m, 1 H); 1,72-1,56 (m, 4 H); 1,42-1,24 (m, 12 H)

20 Método de LCMS 4:

Pureza: 100 % (ELSD)

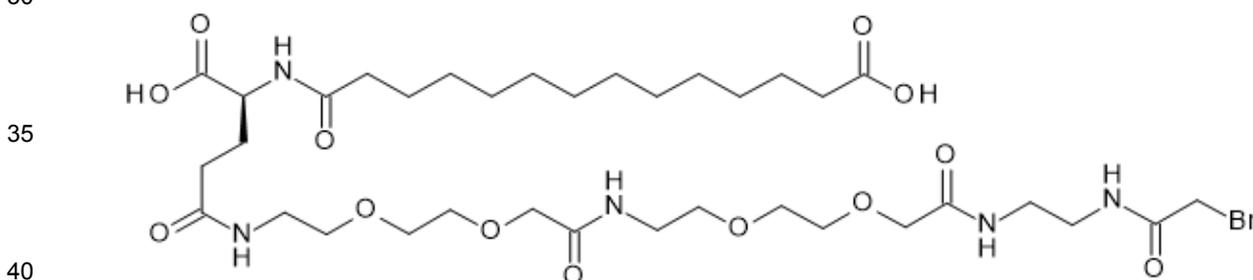
Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,74 min.

25

Teórico, m/z, z=1:813,8, Encontrado m/z, z=1: 812,0, 814,0

Ejemplo 4.3: Preparación del ácido 13-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]tridecanoico

30



45 Se preparó ácido 13-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]tridecanoico mediante el mismo método como se describió en el Ejemplo 4.1 que resulta en un aceite amarillo espeso.

45

Espectro de 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,61 (dd, J=8,9 y 4,9 Hz, 1 H); 4,13 (s, 2 H); 4,11 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,77-3,40 (m, 20 H); 2,49-2,18 (m, 7 H); 2,16-2,07 (m, 1 H); 1,70-1,56 (m, 4 H); 1,31 (bs, 16 H).

Método de LCMS 4:

50

Pureza: 100 % (ELSD)

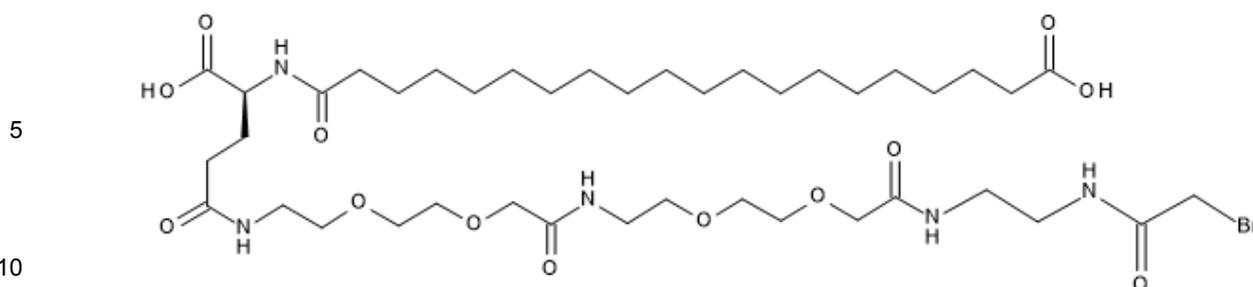
Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,94 min.

55 m/z teórico, z=1: 841,9, encontrado: m/z, z=1: 841,7, 843,7

Ejemplo 4.4: Preparación del ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico

60

65



15 Se preparó ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-Bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etil-carbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico mediante el mismo método como se describió en el Ejemplo 4.1 que resulta en un polvo beis.

Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,65-4,57 (m, 1 H); 4,13 (s, 2 H); 4,10 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,77-3,43 (m, 20 H); 2,49-2,40 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 2,39-2,23 (m, 5 H); 2,17-2,07 (m, 1 H); 1,68-1,57 (m, 4 H); 1,30 (bs, 28 H)

20 Método de LCMS 4:

Pureza: 100 % (ELSD)

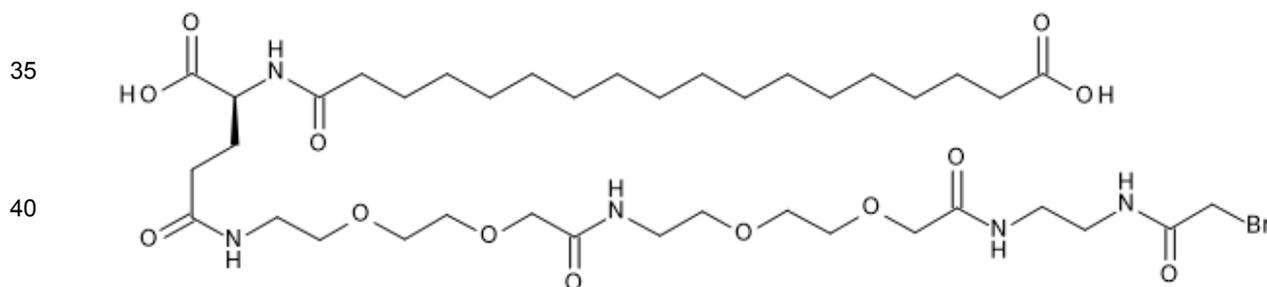
Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,17 min.

25

Masa teórica: 926,0, Encontrado m/z: 926 (M+H)+

Ejemplo 4.5: Preparación de

30 ácido 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico



45 Protocolo sintético de la fase de solución:

Etapa 1: bencilo 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-aminoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-benciloxicarbonil-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato. A una solución de etilendiamina (8,5 ml) en DCM (80 ml) y trietilamina (5,2 ml) a 0 °C se añadió una solución de bencilo 18-[[[(1S)-1-benciloxicarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato (26 g), preparado como se describe en el documento núm. WO10029159, en forma de gotas en DCM (320 ml) en forma de gotas, durante 75 min. Después de la agitación durante 2 h, el precipitado se filtró. Al filtrado se añadió agua (200 ml) e isopropanol (50 ml). La mezcla se extrajo. La capa orgánica se secó mediante el uso de MgSO4. El MgSO4 se eliminó mediante filtración y el filtrado se secó al vacío para dar el compuesto del título 20,07 g (81 %) LCMS: Masa teórica: 956,2; Encontrado m/z, z=1: 957,0

Etapa 2: bencilo 18-[[[(1S)-1-benciloxicarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato

60 Se disolvió ácido cloroacético (0,19 g) en DCM (15 ml). Se añadió N-hidroxisuccinimida (0,22 g) y EDAC HCl (0,42 g). Luego de agitarse durante 2,5 h bencilo 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-aminoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-benciloxicarbonil-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato (1,5 g) en DCM (5 ml). Después de agitar durante la noche a RT la mezcla se extrajo con HCl 1M (2x20 ml) y agua/salmuera 2:1 (30 ml). La capa orgánica se secó (MgSO4), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar un aceite transparente, 1,37 g (84 %)

65

LCMS: Masa teórica: 1032,7; Encontrado m/z, z=1: 1033,1

Etapa 3: Ácido 18-[[[(1S)-1-Carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico

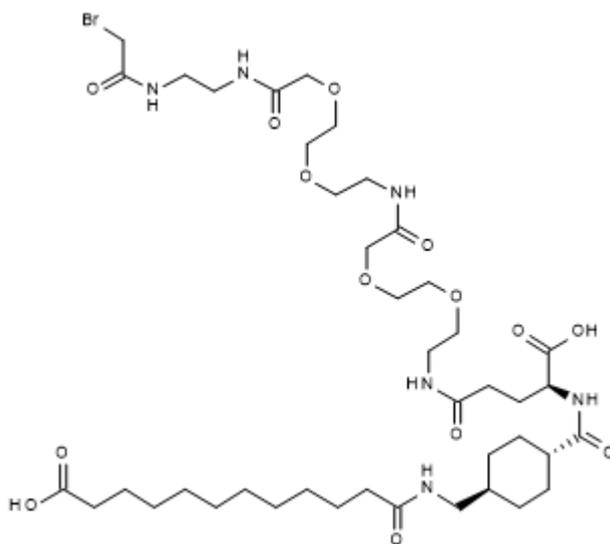
se añadió a una solución de 18-[[[(1S)-1-benziloxicarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]-18-oxo-octadecanoato (10,5 g) en acetona (140 ml) al 10 % PD/C (1,0 g) luego de la aireación con nitrógeno. Después de la hidrogenación durante 6h, la mezcla se calentó a 40-50 °C antes de la filtración. El precipitado en el filtrado frío se aisló y se lavó con acetona y se secó para dar el compuesto del título, 7,42 g (85 %).

Etapa 4: ácido 8-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-Bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico.

A una suspensión de acetona de ácido 18-[[[(1S)-1-Carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico (60 ml) se añadió bromuro de sodio (5 eq, 1,21 g). La mezcla se agitó a RT en la oscuridad. Después de 2h se añadió más bromuro de sodio (10 eq, 2,41 g). Después de 2 días se añadió bromuro de sodio (5 eq, 1,21 g). Después de 5 días la mezcla se concentró. A la mitad del residuo se añadió DCM (30 ml), 10 % de ácido ascórbico (20 ml) y agua 30 ml. A la emulsión se añadió isopropanol (50 ml) y agua (30 ml). La fase orgánica se separó y se lavó dos veces con una mezcla de ácido ascórbico al 10 % (20 ml) e isopropanol (10 ml). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar un aceite sólido, que se cristalizó en acetona y se aisló por filtración para dar al compuesto del título contaminado con el material de partida, 0,80 g (72 %).

LCMS: Masa teórica: 896,9. Encontrado m/z, z=1: 898,9 (M+1)

Ejemplo 4.6: Preparación de ácido 12-[[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-12-oxo-dodecanoico



Protocolo Sintético en Fase Sólida:

La resina de 2-clorotritilo malla de 100-200 1,8 mmol/g (1, 11,9 g, 21,4 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (80 ml) durante 20 minutos. Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 5,50 g, 14,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (9,44 ml, 54,2 mmol) en diclorometano seco (70 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 4 horas. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (4,97 ml, 28,5 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 5 min, 2 x 57 ml). Luego la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 11,0 g, 28,5 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 10,1 g, 28,5 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (9,93 ml, 57,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol

(2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 9,11 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,60 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió la solución de ácido 4-[(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)metil]ciclohexanacarboxílico (Fmoc-Trx-OH, 9,11 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,60 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió la solución de ácido dodecanodioico mono-terc-butil éster (C12(OtBu)-OH, 6,13 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,61 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en mezcla de diclorometano/N,N-dimetilformamida (4:1, 80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 horas. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (6 x 80 ml), diclorometano (4 x 80 ml), metanol (4 x 80 ml) y diclorometano (7 x 80 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (80 ml) durante 18 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 80 ml), mezcla diclorometano/2-propanol (1:1, 4 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (6 x 80 ml). Las soluciones se combinaron; el solvente evaporado y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 1:0-9:1). El producto puro (2) se secó al vacío y se obtuvo como aceite.

25 Rendimiento: 5,40 g (42 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,30.

30 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,45-7,31 (m, 1 H); 7,10-6,97 (m, 1 H); 6,71-6,60 (m, 1 H); 5,70-5,58 (m, 1 H); 4,43-4,31 (m, 1 H); 4,15 (s, 2 H); 4,01 (s, 2 H); 3,79-3,31 (m, 16 H); 3,13-3,08 (m, 2 H); 2,28-1,79 (m, 11 H); 1,71-1,51 (m, 4 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,25 (bs, 12 H); 1,05-0,88 (m, 2 H).

Pureza por LC-MS: 100 %.

35 LC-MS Rt (Sunfire 4,6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,16 min.

LC-MS m/z: 903,0 (M+H)+.

40 Se añadieron posteriormente hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 2,46 g, 6,48 mmol) y trietilamina (1,89 ml, 13,6 mmol) a una solución del aceite anterior (2, 5,31 g, 5,89 mmol) en diclorometano seco (23 ml). Se añadió trietilamina (1,36 ml, 9,72 mmol) a una suspensión de hidrocloreto de ácido (2-amino-etil)-carbámico bencil éster (3, 1,49 g, 6,48 mmol) en diclorometano seco (35 ml) y la mezcla resultante se añadió a la solución anterior. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (70 ml); se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (1 x 70 ml), solución acuosa al 5 % de carbonato de sodio (2 x 70 ml), ácido clorhídrico acuoso 1 M (4 x 70 ml) y salmuera (70 ml); se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5 a 92:8) para proporcionar un aceite amarillo espeso.

50 Rendimiento: 2,81 g (44 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,25.

55 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,41-7,29 (m, 6 H); 7,22-7,13 (m, 1 H); 6,93-6,81 (m, 1 H); 6,62-6,58 (m, 1 H); 5,90-5,81 (m, 1 H); 5,68-5,55 (m, 1 H); 5,09 (s, 2 H); 4,42-4,33 (m, 1 H); 4,01-3,95 (m, 4 H); 3,75-3,30 (m, 20 H); 3,14-3,06 (m, 2 H); 2,31-2,01 (m, 11 H); 1,97-1,76 (m, 1 H); 1,65-1,52 (m, 4 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,27 (bs, 12 H); 1,04-0,87 (m, 2 H).

60 Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 0,15 g, 0,13 mmol) a una solución del compuesto anterior (2,81 g, 2,60 mmol) en metanol (43 ml) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 2,5 horas. El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó cuatro veces con tolueno y se secó al vacío para producir el compuesto 5.

65 Rendimiento: 2,01 g (81 %).

ES 2 742 503 T3

Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,51-7,36 (m, 2 H); 7,04-6,96 (m, 1 H); 6,76-6,66 (m, 1 H); 5,93-5,85 (m, 1 H); 4,41-4,29 (m, 1 H); 4,03-3,99 (m, 4 H); 3,73-3,25 (m, 18 H); 3,13-2,97 (m, 4 H); 2,34-1,78 (m, 11 H); 1,67-1,51 (m, 4 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,30 (m, 12 H); 1,04-0,88 (m, 2 H).

5 Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 70:30 a 100:0 + TFA al 0,1 %): 0,67 min.

LC-MS m/z: 945,0 (M+H)+.

10 Se añadió N,N-Diisopropiletilamina (0,40 ml, 2,28 mmol) a una solución de la amina anterior (5, 1,79 g, 1,90 mmol) en diclorometano seco (30 ml) a -30 °C bajo argón. Se añadió bromuro de bromoacetilo (0,20 ml, 2,28 mmol) en forma de gotas y la solución resultante se agitó a -30 °C durante 3 horas. El baño de enfriamiento se eliminó, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora adicional y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (50 ml), se lavó con solución acuosa al 5 % de ácido cítrico (3 x 50 ml, separación de fases muy lenta), ácido clorhídrico acuoso 1 M (4 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5 a 93:7) para proporcionar un aceite amarillo.

15 Rendimiento: 1,63 g (80 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 95:5): 0,25.

25 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,56-7,48 (m, 1 H); 7,43-7,34 (m, 1 H); 7,04-6,95 (m, 1 H); 6,62 (d, J=7,9 Hz, 1 H); 5,74-5,63 (m, 1 H); 4,43-4,33 (m, 1 H); 4,02 (s, 4 H); 3,85 (s, 2 H); 3,73-3,40 (m, 20 H); 3,14-3,09 (m, 2 H); 2,34-2,04 (m, 9 H); 1,97-1,76 (m, 4 H); 1,68-1,51 (m, 7 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,27 (m, 12 H); 1,07-0,90 (m, 2 H).

30 Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,16 min.

LC-MS m/z: 1066,0 (M+H)+.

35 El compuesto anterior (1,53 g, 1,44 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (25 ml) y se dejó en reposo durante 1,5 horas. El ácido trifluoroacético se eliminó al vacío y el residuo se coevaporó con tolueno tres veces y diclorometano diez veces para proporcionar un sólido aceitoso amarillo.

40 Rendimiento 810 mg (59 %)

Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4,64-4,54 (m, 1 H); 4,13 (s, 2 H); 4,11 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,78-3,40 (m, 20 H); 3,13-3,10 (d, J=6,6 Hz, 2 H); 2,51-2,19 (m, 9 H); 1,94-1,77 (m, 4 H); 1,68-1,41 (m, 7 H); 1,31 (bs, 12 H); 1,10-0,92 (m, 2 H).

45 Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,82 min.

LC-MS m/z: 952,0 (M+H)+.

50 Ejemplo 4.7: Preparación de ácido 16-[[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butyl]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-16-oxo-hexadecanoico

55

60

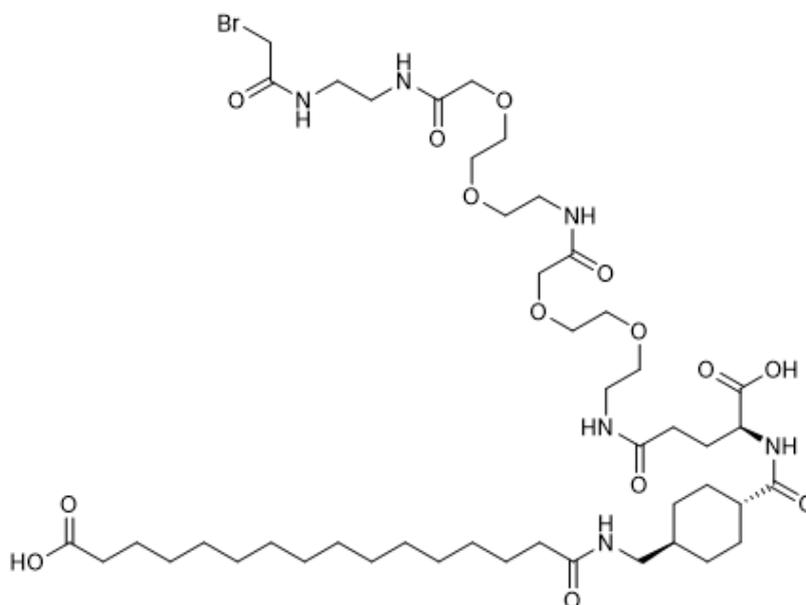
65

5

10

15

20



Protocolo sintético en fase sólida:

25

30

35

40

45

50

55

60

La resina de 2-clorotritilo malla de 100-200 1,8 mmol/g (1, 11,9 g, 21,4 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (80 ml) durante 20 minutos. Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 5,50 g, 14,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (9,44 ml, 54,2 mmol) en diclorometano seco (70 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 4 horas. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (4,97 ml, 28,5 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 5 min, 2 x 57 ml). Luego la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 11,0 g, 28,5 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 10,1 g, 28,5 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (9,93 ml, 57,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N,N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 9,11 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,60 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). La solución de ácido Fmoc-tranexámico (Fmoc-Trx-OH, 9,11 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,60 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml), diclorometano (2 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (100 ml, 2 x 80 ml). Se añadió la solución de ácido hexadecanodioico mono-terc-butil éster (C16(OtBu)-OH, 7,33 g, 21,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 7,61 g, 21,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,71 ml, 38,5 mmol) en mezcla de diclorometano/N,N-dimetilformamida (4:1, 80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 horas. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (6 x 80 ml), diclorometano (4 x 80 ml), metanol (4 x 80 ml) y diclorometano (7 x 80 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (80 ml) durante 18 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 80 ml), mezcla diclorometano/2-propanol (1:1, 4 x 80 ml), 2-propanol (2 x 80 ml) y diclorometano (6 x 80 ml). Las soluciones se combinaron; el solvente evaporado y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 1:0-9:1). El intermedio (2) se secó al vacío y se obtuvo como aceite.

Rendimiento: 8,20 g (80 %).

65

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,20.

ES 2 742 503 T3

Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,44-7,33 (m, 1 H); 7,07-6,97 (m, 1 H); 6,72-6,63 (m, 1 H); 5,70-5,59 (m, 1 H); 4,44-4,33 (m, 1 H); 4,15 (s, 2 H); 4,01 (s, 2 H); 3,76-3,32 (m, 16 H); 3,14-3,07 (m, 2 H); 2,38-1,77 (m, 11 H); 1,71-1,50 (m, 4 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,25 (bs, 20 H); 1,05-0,87 (m, 2 H).

5 Pureza por LC-MS: 100 %.

LC-MS Rt (Sunfire 4,6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,56 min.

LC-MS m/z: 959,0 (M+H)+.

10 Se añadieron posteriormente hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 3,55 g, 9,34 mmol) y trietilamina (2,72 ml, 19,5 mmol) a una solución de intermedio **2** (8,13 g, 8,49 mmol) en diclorometano seco (34 ml). Se añadió trietilamina (1,78 ml, 12,7 mmol) a una suspensión de hidrócloruro de ácido (2-amino-etil)-carbámico bencil éster (2,15 g, 9,34 mmol) en diclorometano seco (51 ml) y la mezcla resultante se añadió a la solución anterior. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (150 ml); se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (1 x 100 ml), solución acuosa al 5 % de carbonato de sodio (2 x 100 ml), ácido clorhídrico acuoso 1 M (4 x 100 ml) y salmuera; se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5 a 92:8) para proporcionar el compuesto **4** como aceite amarillo espeso.

20 Rendimiento: 5,59 g (58 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0,20.

25 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,41-7,31 (m, 6 H); 7,21-7,12 (m, 1 H); 6,92-6,83 (m, 1 H); 6,58-6,52 (m, 1 H); 5,89-5,79 (m, 1 H); 5,62-5,51 (m, 1 H); 5,10 (s, 2 H); 4,43-4,32 (m, 1 H); 4,05-3,92 (m, 4 H); 3,75-3,30 (m, 20 H); 3,15-3,07 (m, 2 H); 2,33-2,03 (m, 11 H); 1,97-1,68 (m, 1 H); 1,67-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,26 (bs, 20 H); 1,05-0,87 (m, 2 H).

30 Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 70:30 a 100:0 + TFA al 0,1 %): 1,41 min.

35 LC-MS m/z: 1136,0 (M+H)+.

40 Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 0,27 g, 0,24 mmol) a una solución del compuesto anterior (**4**, 5,59 g, 4,93 mmol) en metanol (85 ml) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 2,5 horas. El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se coevaporó cuatro veces con tolueno y se secó al vacío para producir el compuesto **5**.

Rendimiento: 3,45 g (70 %).

45 Espectro 1H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,43-7,33 (m, 2 H); 7,05-6,94 (m, 1 H); 6,72-6,65 (m, 1 H); 5,69-5,59 (m, 1 H); 4,44-4,33 (m, 1 H); 4,03-3,98 (m, 4 H); 3,72-3,39 (m, 18 H); 3,15-3,07 (m, 2 H); 2,96-2,90 (m, 2 H); 2,34-1,78 (m, 13 H); 1,71-1,51 (m, 7 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,25 (m, 20 H); 1,07-0,93 (m, 1 H).

Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

50 LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 70:30 a 100:0 + TFA al 0,1 %): 0,76 min.

LC-MS m/z: 1001,0 (M+H)+.

55 Se añadió N,N-Diisopropiletilamina (0,73 ml, 4,14 mmol) a una solución de la amina anterior (**5**, 3,45 g, 3,45 mmol) en diclorometano seco (55 ml) a -30 °C bajo argón. Se añadió bromuro de bromoacetilo (0,36 ml, 4,14 mmol) en forma de gotas y la solución resultante se agitó a -30 °C durante 3 horas. El baño de enfriamiento se eliminó, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora adicional y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución acuosa al 5 % de ácido cítrico (3 x 100 ml, separación de fases muy lenta), ácido clorhídrico acuoso 1 M (4 x 100 ml) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0-063 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5 a 93:7) para proporcionar el compuesto **6** como aceite amarillo.

60 Rendimiento: 1,63 g (44 %).

65 RF (SiO₂, diclorometano/metanol 95:5): 0,15.

Espectro ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , dH): 7,55-7,46 (m, 1 H); 7,43-7,33 (m, 1 H); 6,99-6,89 (m, 1 H); 6,58 (d, $J=7,5$ Hz, 1 H); 5,72-5,59 (m, 1 H); 4,44-4,32 (m, 1 H); 4,02 (s, 4 H); 3,85 (s, 2 H); 3,74-3,40 (m, 20 H); 3,14-3,09 (m, 2 H); 2,33-2,05 (m, 9 H); 2,01-1,76 (m, 4 H); 1,67-1,53 (m, 7 H); 1,46 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,25 (m, 20 H); 1,07-0,89 (m, 2 H).

5

Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,47 min.

10 LC-MS m/z: 1122,0 (M+H)+.

El compuesto anterior (**6**, 1,63 g, 1,53 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (25 ml) y se dejó reposar durante 1,5 horas. El ácido trifluoroacético se eliminó al vacío y el residuo se coevaporó con tolueno tres veces. Se añadió éter de dietilo (120 ml) al residuo oleoso y la mezcla se agitó durante 1 hora. Luego, el precipitado se filtró y el residuo se secó al vacío para proporcionar un polvo blanco.

15

Rendimiento: 1,55 g (90 %).

Espectro ^1H NMR (300 MHz, AcOD-d_4 , dH): 4,65-4,56 (m, 1 H); 4,14 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,98 (s, 2 H); 3,78-3,44 (m, 20 H); 3,14-3,10 (d, $J=6,8$ Hz, 2 H); 2,48-2,21 (m, 8 H); 2,18-2,10 (m, 1 H); 1,97-1,79 (m, 4 H); 1,70-1,46 (m, 7 H); 1,32 (bs, 20 H); 1,11-0,93 (m, 2 H).

20

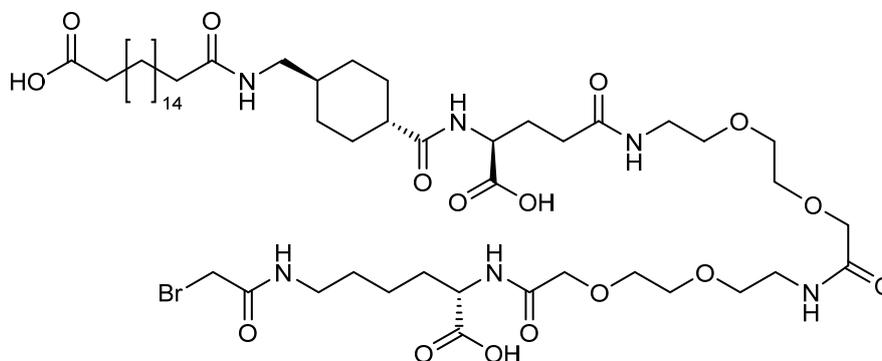
Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

25 LC-MS Rt (Kinetex, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,32 min.

LC-MS m/z: 1008,0 (M+H)+.

Ejemplo 4.8: Preparación de ácido 18-[[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxipentil]pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-18-oxo-octadecanoico

30



35

40

45

Protocolo sintético:

Se dejó hinchar la resina Wang Fmoc-Lys(Mtt) 0,26 mmol/g (1, 11,7 g, 3,05 mmol) en diclorometano (100 ml) durante 45 minutos. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 2,35 g, 6,09 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 2,17 g, 6,09 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,12 ml, 12,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 2,35 g, 6,09 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 2,17 g, 6,09 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,12 ml, 12,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml) para obtener el intermedio 1. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 1,94 g, 4,57 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-

50

55

60

65

tetrametiluronio (TCTU, 1,62 g, 4,57 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,43 ml, 8,23 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido 4-[(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)metil]ciclohexanacarboxílico (Fmoc-Trx-OH, 1,73 g, 4,57 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,62 g, 4,57 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,43 ml, 8,23 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml) para obtener el intermedio 2. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 50 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml), 2-propanol (3 x 50 ml) y diclorometano (3 x 30 ml). Se añadió solución de ácido octadecanodioico mono-terc-butil éster (C18(OtBu)-OH, 0,85 g, 2,28 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 0,81 g, 2,28 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,72 ml, 4,11 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml), diclorometano (3 x 50 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml). El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en diclorometano al 80 % (2 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 50 ml). La resina se lavó con diclorometano (6 x 50 ml). Se añadió solución de ácido bromoacético (4,24 g, 30,5 mmol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 4,01 ml, 25,9 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 45 minutos. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (5 x 50 ml) y diclorometano (10 x 50 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (50 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con ácido trifluoroacético (1 x 25 ml) y diclorometano (2 x 30 ml). Las soluciones se combinaron y los solventes se evaporaron hasta la sequedad dando el compuesto como aceite pardusco espeso.

Rendimiento 2,18 mg (64 %).

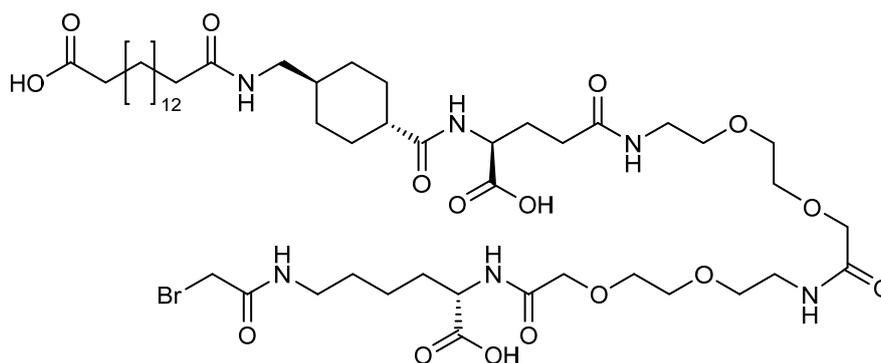
Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, 80°C, dH): 4,72-4,55 (m, 2 H); 4,16 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,80-3,62 (m, 12 H); 3,58-3,44 (m, 4 H); 3,32 (t, J=6,8 Hz, 2 H); 3,15 (d, J=6,8 Hz, 2 H); 2,51-2,07 (m, 8 H); 2,01-1,77 (m, 6 H); 1,72-1,44 (m, 11 H); 1,33 (bs, 24 H); 1,13-0,95 (m, 2 H).

Pureza por LC-MS: 96 %.

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,68 min.

LC-MS m/z: 1124,1 (M+H)+.

Ejemplo 4.9: Preparación de ácido 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxipentil]pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-16-oxo-hexadecanoico



El procedimiento sintético fue similar al ejemplo 4.8, excepto porque en las etapas sintéticas luego del intermedio 2 se usó ácido hexadecanodioico mono-terc-butil éster (C16(OtBu)-OH) en lugar de ácido octadecanodioico mono-terc-butil éster (C18(OtBu)-OH). El producto se obtuvo como un aceite pardusco espeso.

Rendimiento 2,05 mg (62 %).

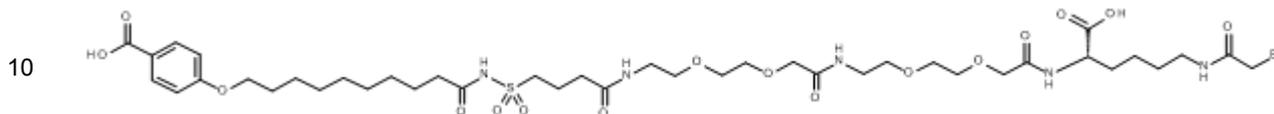
Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, 80°C, dH): 4,71-4,55 (m, 2 H); 4,16 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,79-3,62 (m, 12 H); 3,58-3,44 (m, 4 H); 3,32 (t, J=6,7 Hz, 2 H); 3,15 (d, J=6,6 Hz, 2 H); 2,49-2,07 (m, 8 H); 2,01-1,77 (m, 6 H); 1,72-1,44 (m, 11 H); 1,33 (bs, 20 H); 1,13-0,97 (m, 2 H).

Pureza por LC-MS: 92 %.

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 3,38 min.

LC-MS m/z: 1096,0 (M+H)+.

- 5 Ejemplo 4.10: Preparación de ácido 4-[10-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]benzoico

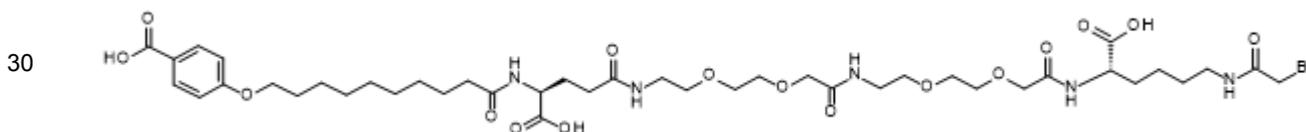


15 El procedimiento sintético fue similar al ejemplo 4.8, excepto porque en las etapas sintéticas luego del intermedio 1 primero 3-carboxipropanosulfonamida y posteriormente el ácido 10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi)decanoico se acoplaron a la resina mediante el uso de procedimientos sintéticos estándar de protección/desprotección de Fmoc. Las etapas sintéticas posteriores, escisión y metodología como se ejemplifica en el ejemplo 4.8 proporcionaron un sólido blanco.

20 LC-MS m/z:998,54 (M1+).

UPLC5: método 09_B4_1, Rt=8,3004 min (pH 2,3); 98 % de pureza.

- 25 Ejemplo 4.11: Preparación de ácido 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]benzoico

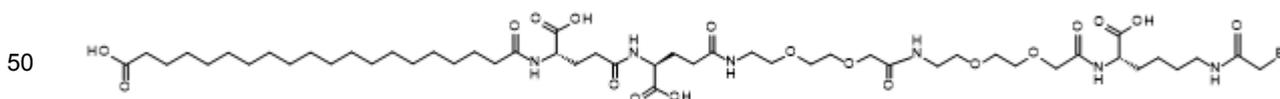


35 El procedimiento sintético fue similar al ejemplo 4.8, excepto porque en las etapas sintéticas luego del intermedio 1 primero el ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-util-éster (Fmoc-LGlu-OtBu) y posteriormente el ácido 10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi)decanoico se acoplaron a la resina mediante el uso de procedimientos sintéticos estándar de protección/desprotección de Fmoc. Las etapas sintéticas posteriores, escisión y metodología como se ejemplifica en el ejemplo 4.8 proporcionaron un sólido blanco.

40 LC-MS m/z: 978,55(M1+).

UPLC5: método 09_B4_1, Rt=7,573 min (pH 2,3); 99 % de pureza.

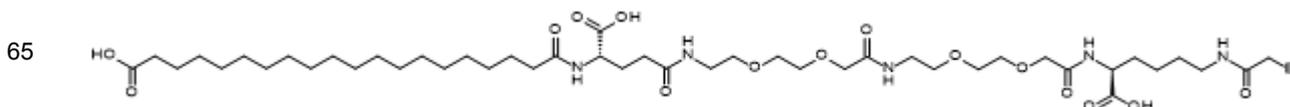
- 45 Ejemplo 4.12: Preparación de ácido 20-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-20-oxo-icosanoico



55 El procedimiento sintético fue similar al ejemplo 4.8, excepto porque en las etapas sintéticas luego del intermedio 1 primero el ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu) se acopló a la resina dos veces, después de lo cual se acopló el ácido 20-terc-butoxi-20-oxo-icosanoico (C20(OtBu)-OH) a la resina mediante el uso de procedimientos sintéticos estándar de protección/desprotección de Fmoc. Las etapas sintéticas posteriores, escisión y metodología como se ejemplifica en el ejemplo 4.8 proporcionaron un sólido blanco.

LC-MS m/z: 1141,2 (M+H)+.

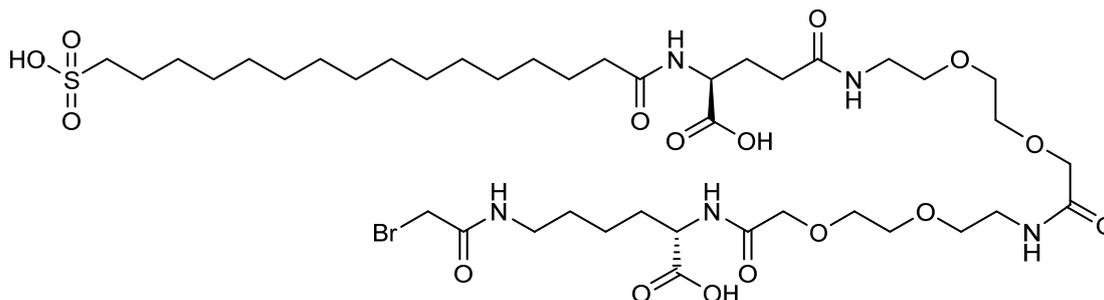
- 60 Ejemplo 4.13: Preparación de ácido 20-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-20-oxo-icoasnoico



El procedimiento sintético fue similar al ejemplo 4.8, excepto porque en las etapas sintéticas luego del intermedio 1 primero el ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu) se acopló a la resina, después de lo cual se acopló el ácido 20-terc-butoxi-20-oxo-icosanoico (C20(OtBu)-OH) a la resina mediante el uso de procedimientos sintéticos estándar de protección/desprotección de Fmoc. Las etapas sintéticas posteriores, escisión y metodología como se ejemplifica en el ejemplo 4.8 proporcionaron un sólido blanco.

LC-MS m/z: 1012,0 (M+H)+.

Ejemplo 4.14: Preparación de ácido (2S,25S)-2-(4-(2-Bromoacetamido)butil)-4,13,22-trioxo-25-(15-sulfopentadecanamido)-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21-triazahexacosanedioico



Protocolo sintético:

Se dejó hinchar la resina Wang Fmoc-Lys(Mtt) 0,26 mmol/g (1, 36,7 g, 9,55 mmol) en diclorometano (200 ml) durante 45 minutos. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 7,36 g, 19,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 6,79 g, 19,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,66 ml, 38,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 7,36 g, 19,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 6,79 g, 19,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,66 ml, 38,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 6,10 g, 14,3 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 5,09 g, 14,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (4,49 ml, 25,8 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). La resina se separó en tres porciones, se añadió una solución de ácido sódico 16-sulfo-hexadecanoico (3, 2,28 g, 6,37 mmol, hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP, 3,31 g, 6,37 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,22 ml, 12,8 mmol) en sulfóxido de dimetilo (80 ml) a un tipo de resina anterior y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con mezcla de N,N-dimetilformamida:agua (3:1, 3 x 80 ml), N,N-dimetilformamida (3 x 80 ml), diclorometano (3 x 80 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 80 ml). El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en diclorometano al 80 % (3 x 10 min, 2 x 30 min, 5 x 80 ml). La resina se lavó con diclorometano (6 x 80 ml). Se añadió solución de ácido bromoacético (6,64 g, 47,8 mmol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 5,26 ml, 34,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (80 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 45 minutos. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 80 ml) y diclorometano (10 x 80 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (100 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con ácido trifluoroacético (1 x 40 ml) y diclorometano (3 x 50 ml). Las soluciones se combinaron y los solventes se evaporaron hasta la sequedad dando un aceite pardusco espeso. El aceite se disolvió en mezcla de agua:acetonitrilo (4:1, 25 ml) y la solución se pasó a través de una columna (7 x 10 cm) de Dowex 50WX4 en la forma H+ (malla de 50-100; eluyente: agua). Las fracciones con pH ácido se combinaron y se liofilizaron para dar un polvo blanco.

Rendimiento: 2,17 g (68 %).

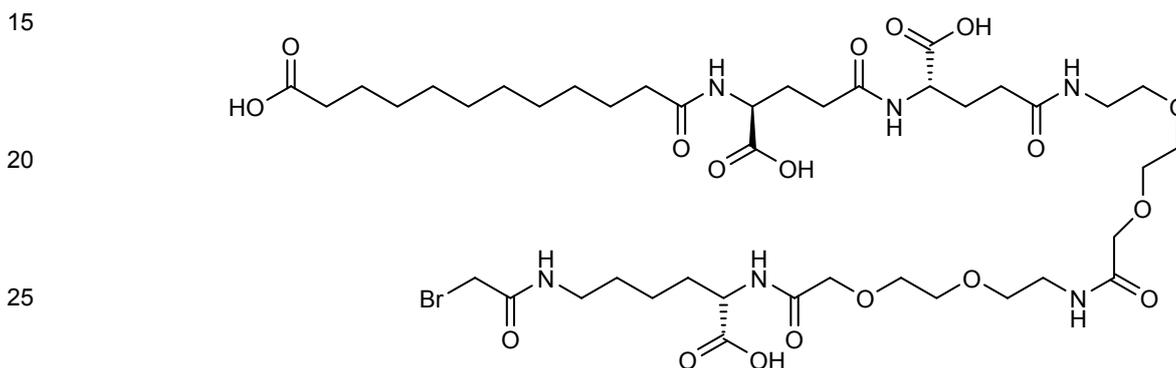
Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, 80 °C, dH): 4,74-4,56 (m, 2 H); 4,16 (d, J=5,3 Hz, 4 H); 3,95 (s, 2 H); 3,82-3,64 (m, 12 H); 3,61-3,47 (m, 4 H); 3,33 (t, J=6,9 Hz, 2 H); 3,17-3,07 (m, 2 H); 2,54 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 2,38 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,34-2,09 (m, 2 H); 2,01-1,93 (m, 1 H); 1,93-1,78 (m, 3 H); 1,74-1,57 (m, 4 H); 1,57-1,29 (m, 24 H).

5 Pureza por LC-MS: 100 %.

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,86 min.

LC-MS m/z: 1003,9 (M+H)+.

10 Ejemplo 4.15: Preparación de: ácido 12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxipentil]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico



30 Protocolo sintético:

35 Se dejó hinchar la resina Wang Fmoc-Lys(Mtt) 0,26 mmol/g (1, 36,7 g, 9,55 mmol) en diclorometano (200 ml) durante 45 minutos. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 7,36 g, 19,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 6,79 g, 19,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,66 ml, 38,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 7,36 g, 19,1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 6,79 g, 19,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,66 ml, 38,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 6,10 g, 14,3 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 5,09 g, 14,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (4,49 ml, 25,8 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (150 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). La resina se separó en tres porciones, se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 2,03 g, 4,78 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,70 g, 4,78 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,50 ml, 8,60 mmol) en N,N-dimetilformamida (70 ml) a un grupo de resinas anteriores (2) y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 70 ml), diclorometano (2 x 70 ml) y N,N-dimetilformamida (70 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 70 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 70 ml), 2-propanol (2 x 70 ml) y diclorometano (2 x 70 ml). Se añadió la solución de ácido dodecanodioico mono-terc-butil éster (C12(OtBu)-OH, 1,37 g, 4,78 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,70 g, 4,78 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,50 ml, 8,60 mmol) en mezcla de diclorometano/N,N-dimetilformamida (4:1, 70 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml). El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en diclorometano al 80 % (3 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 70 ml). La resina se lavó con diclorometano (6 x 70 ml). Se añadió solución de ácido bromoacético (6,60 g, 47,8 mmol) y

N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 5,30 ml, 34,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (90 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 30 minutos. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 70 ml) y diclorometano (10 x 70 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (100 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con ácido trifluoroacético (1 x 40 ml) y diclorometano (2 x 40 ml). Las soluciones se combinaron y los solventes se evaporaron hasta la sequedad dando un aceite pardusco espeso.

Rendimiento 2,94 mg (90 %).

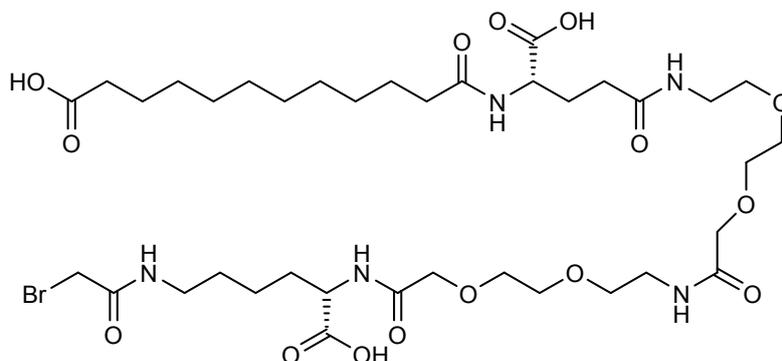
Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,74-4,53 (m, 3 H); 4,17 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,81-3,40 (m, 16 H); 3,31 (t, J=6,8 Hz, 2 H); 2,57-2,20 (m, 10 H); 2,16-2,04 (m, 3 H); 1,89-1,75 (m, 1 H); 1,72-1,54 (m, 6 H); 1,52-1,41 (m, 2 H); 1,32 (bs, 12 H).

Pureza por LC-MS: 100 %.

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,64 min.

LC-MS m/z: 1028,0 (M+H)+.

Ejemplo 4.16: Preparación de ácido 12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxipentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico



El procedimiento sintético fue el mismo que para el ejemplo 4.8, excepto que en las etapas sintéticas luego del intermedio 1 primero el ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu) y posteriormente ácido 12-terc-butoxi-12-oxo-dodecanoico se acoplaron a la resina mediante el uso de procedimientos sintéticos estándar protección/desprotección de Fmoc. Las etapas sintéticas posteriores, escisión y metodología como se ejemplifica en el ejemplo 4.8 proporcionaron el compuesto como un aceite pardusco espeso.

Rendimiento: 97 %

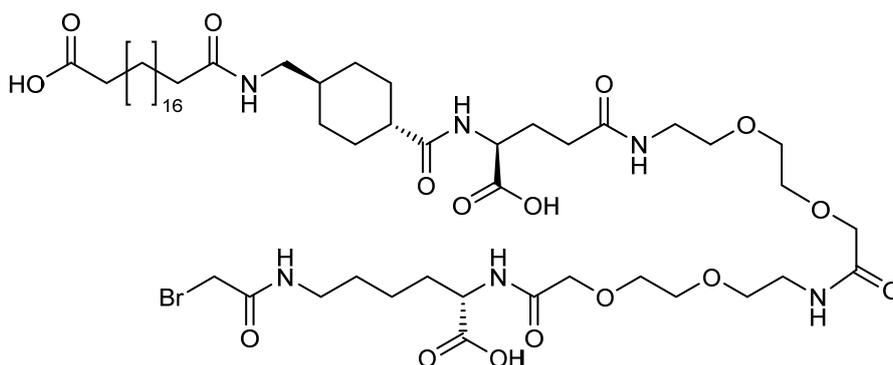
Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,73-4,55 (m, 2 H); 4,17 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,96 (s, 2 H); 3,80-3,42 (m, 16 H); 3,31 (t, J=6,78 Hz, 2 H); 2,49-2,17 (m, 7 H); 2,01-1,92 (m, 2 H); 1,87-1,76 (m, 1 H); 1,70-1,54 (m, 6 H); 1,52-1,41 (m, 2 H); 1,32 (bs, 12 H).

Pureza por LC-MS: 100 %.

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,72 min.

LC-MS m/z: 900,0 (M+H)+.

Ejemplo 4.17: Preparación de ácido 20-[[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxipentil]pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-20-oxo-icosanoico



Protocolo sintético:

Se dejó hinchar la resina Wang Fmoc-Lys(Mtt) 0,26 mmol/g (1, 11,2 g, 2,90 mmol) en diclorometano (100 ml) durante 45 minutos. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 2,23 g, 5,80 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 2,06 g, 5,80 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,02 ml, 11,6 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 2,23 g, 5,80 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 2,06 g, 5,80 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,02 ml, 11,6 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico 1-terc-butil éster (Fmoc-LGlu-OtBu, 1,85 g, 4,35 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,55 g, 4,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,36 ml, 7,82 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 1,5 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido 4-[(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)metil]ciclohexanecarboxílico

(Fmoc-Trx-OH, 1,65 g, 4,35 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,55 g, 4,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,36 ml, 7,82 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), 2-propanol (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido icosanodioico mono-terc-butil éster (C20(OtBu)-OH, 1,73 g, 4,35 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 1,55 g, 4,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,36 ml, 7,82 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml), diclorometano (3 x 90 ml), N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml) y diclorometano (3 x 90 ml). El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en diclorometano al 80 % (2 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 100 ml). La resina se lavó con diclorometano (6 x 90 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 90 ml). Se añadió solución de ácido bromoacético (8,06 g, 58,0 mmol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 7,60 ml, 49,3 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a la resina y la mezcla se agitó durante 40 minutos. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (5 x 90 ml) y diclorometano (12 x 90 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (100 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con ácido trifluoroacético (1 x 50 ml) y diclorometano (7 x 70 ml). Las soluciones se combinaron y los solventes se evaporaron hasta la sequedad dando un aceite pardusco espeso.

Rendimiento: 3,28 g (98 %).

Espectro 1H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, 80 °C, dH): 4,68 (dd, J=8,0 y 5,4 Hz, 1 H); 4,60 (dd, J=7,9 y 5,3 Hz, 1 H); 4,16 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,94 (s, 2 H); 3,81-3,61 (m, 12 H); 3,59-3,44 (m, 4 H); 3,32 (t, J=6,8 Hz, 2 H); 3,14 (d, J=6,8 Hz, 2 H); 2,49-1,79 (m, 15 H); 1,73-1,43 (m, 11 H); 1,33 (s, 28 H); 1,11-0,96 (m, 2 H).

Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 4,04 min.

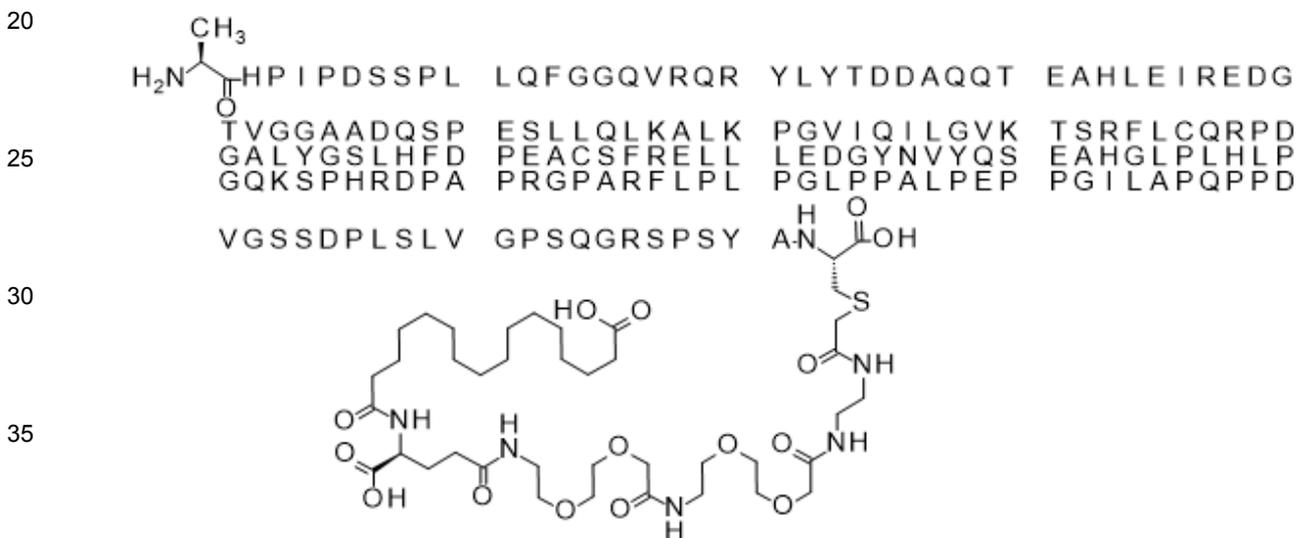
5 LC-MS m/z: 1151,3 (M+H)+.

Ejemplo 5: Preparación de derivados de FGF21

10 La preparación de un derivado de FGF21 representativo se proporciona en el Ejemplo 5.1 (Compuesto 21). Los derivados de FGF21 de los Ejemplos 5.2-5.14 (Compuestos 11-20 y 22-14) se preparan mediante el método proporcionado en el Ejemplo 5.1. El derivado de FGF21 de los ejemplos 5.15-5.37 se prepara mediante el método proporcionado en el Ejemplo 5.1 o como se describe a continuación.

Ejemplo 5.1: Compuesto 21

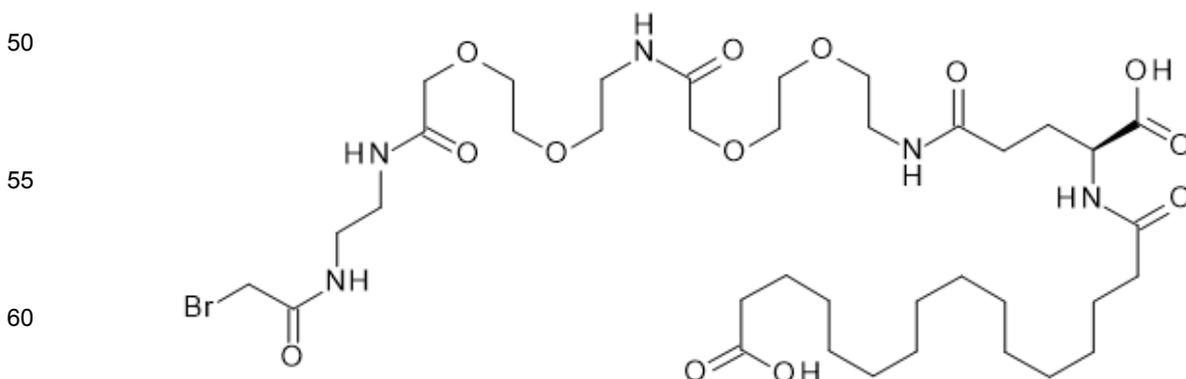
15 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver el ejemplo 3).

El compuesto 21 se preparó de la siguiente manera:

45 El residuo de Cys en la posición 181 en el análogo S{Beta-181}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 de la SEQ NO:10, preparado como se describe generalmente en los Ejemplos 1-3, se modificó en el grupo tiol del residuo de Cys en la posición 181C con el reactivo preparado en el ejemplo 4.1:



65 Al Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 protegido por cisteamina (70 mg, 0,0036 mmol), en Tris y tampón de NaCl (1,35 mg/ml) se añadió Tris en agua para ajustar el pH a 8,0. Se añadió BSPP (Bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidrato de sal dipotásica, 12 mg) disuelta en agua y se agitó suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió

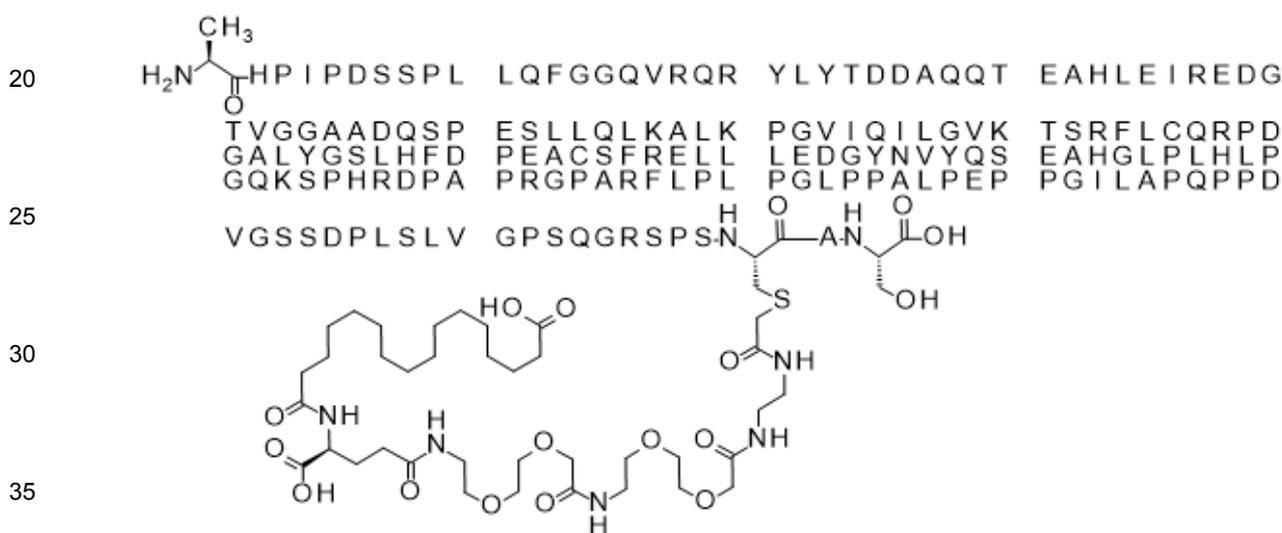
ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]-metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}} pentadecanoico (19 mg, 0,022 mmol) en etanol (0,5 ml). Después de agitarse suavemente durante toda la noche, se añadió agua MiliQ (150 ml) para disminuir la conductividad a 2,5 mS/cm. La mezcla se purificó mediante el uso de intercambio aniónico en una columna MonoQ 10/100 GL con el uso de tampón A: Tris 20 mM, pH 8,0; tampón B: Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0, flujo 6 ml y un gradiente de 0-80 % de B en 60 CV. Rendimiento: 37 mg 51 %.

Método de LCMS 2:

Masa teórica: 20279,9; Encontrado: 20280,4

Ejemplo 5.2: Compuesto 11

S{Beta-178}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:6 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]-metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}}pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

Método de LCMS 2

Masa teórica: 20279,9; Encontrado: 20280,2

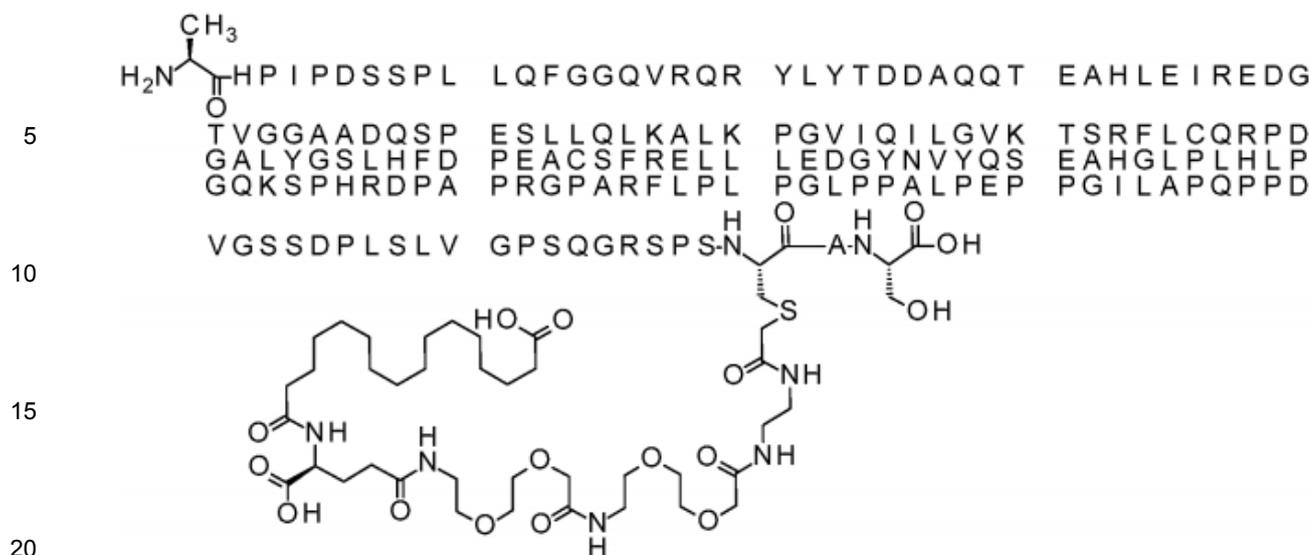
Ejemplo 5.3: Compuesto 12

S{Beta-179}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21

55

60

65



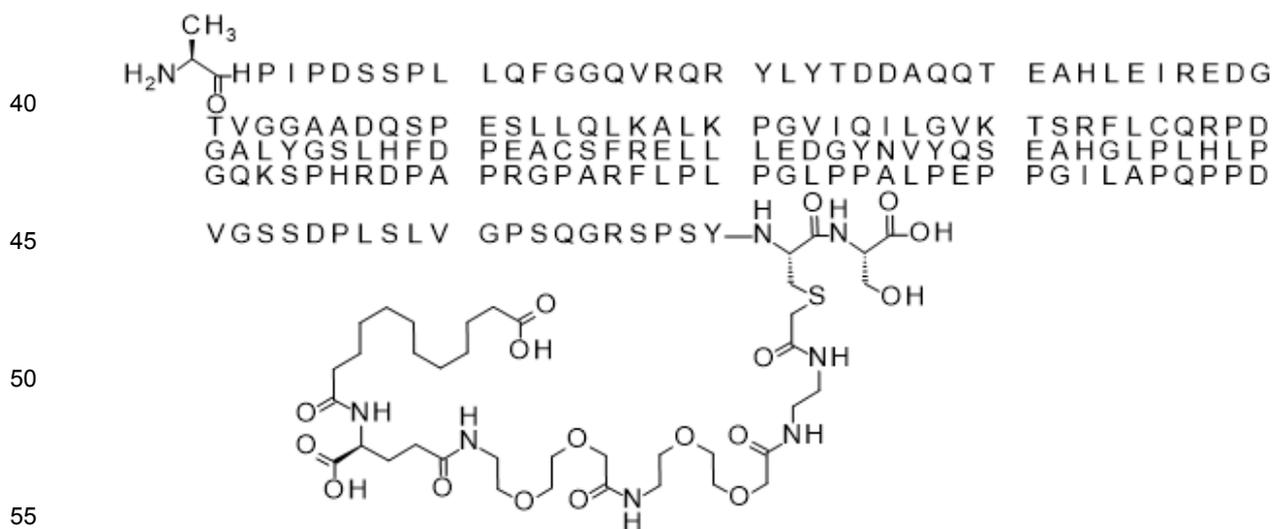
25 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:7 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido de 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)-etilcarbamoyl]metoxi)etoxi]-etilcarbamoyl]metoxi)etoxi]etilcarbamoyl]propilcarbamoyl]pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

Método de LCMS 3

Masa teórica: 20203,8; Encontrado: 20204,2

Ejemplo 5.4: Compuesto 13

35 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4(S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



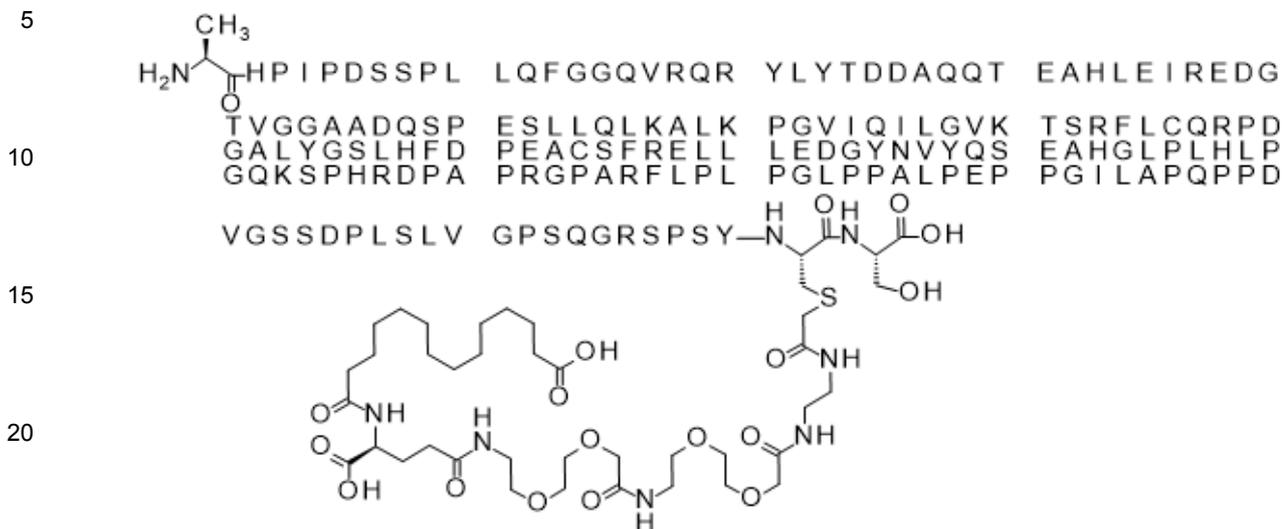
60 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 11-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)-etilcarbamoyl]metoxi)-etoxi]etilcarbamoyl]metoxi)etoxi]etilcarbamoyl]-propilcarbamoyl]undecanoico del Ejemplo 4.2.

Método de LCMS 2

Masa teórica: 20239,8; Encontrado: 20240,1

Ejemplo 5.5: Compuesto 14

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



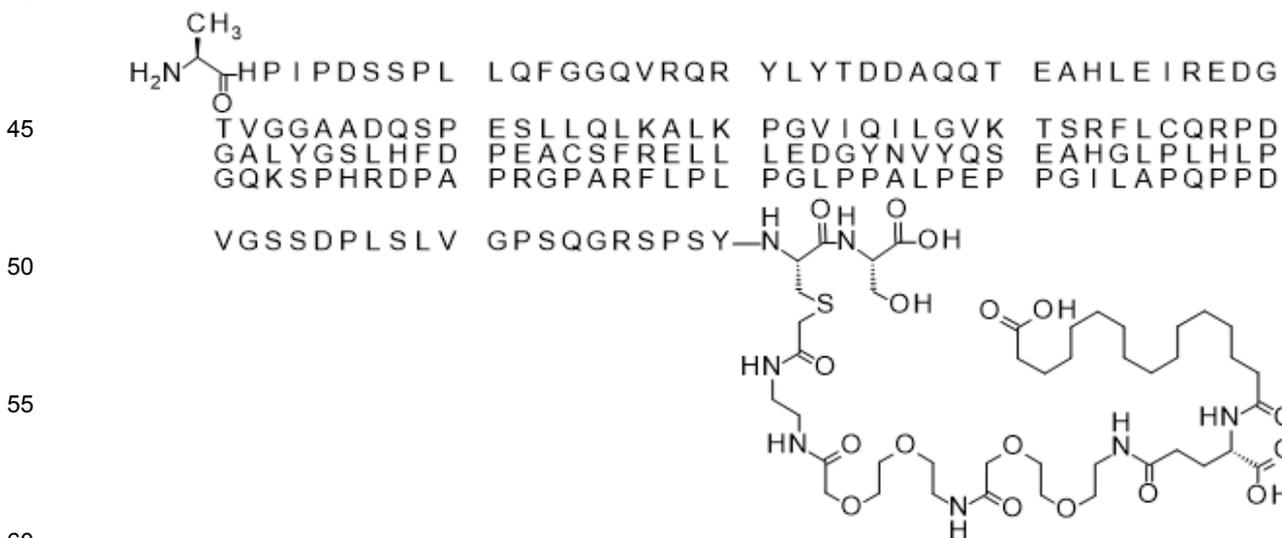
Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 13-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}tridecanoico del Ejemplo 4.3.

Método de LCMS 3:

Masa teórica: 20267,8; Encontrado: 20268,1

Ejemplo 5.6: Compuesto 15

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



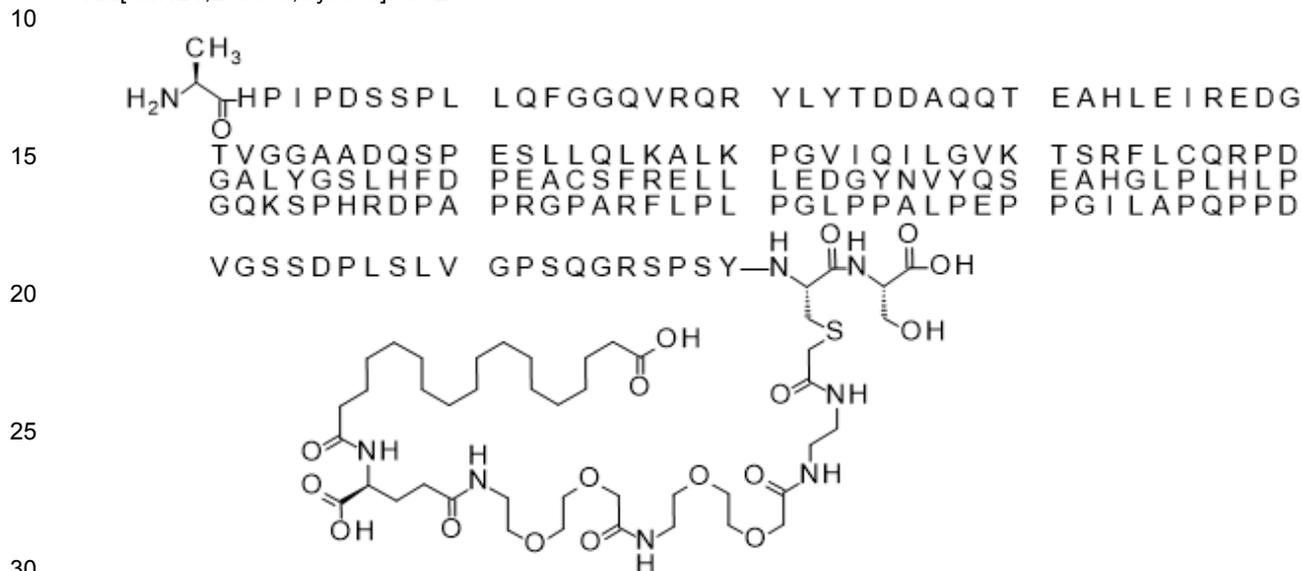
Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

Método de LCMS 2:

Masa teórica: 20295,9; Encontrado: 20296,2

5 Ejemplo 5.7: Compuesto 16

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



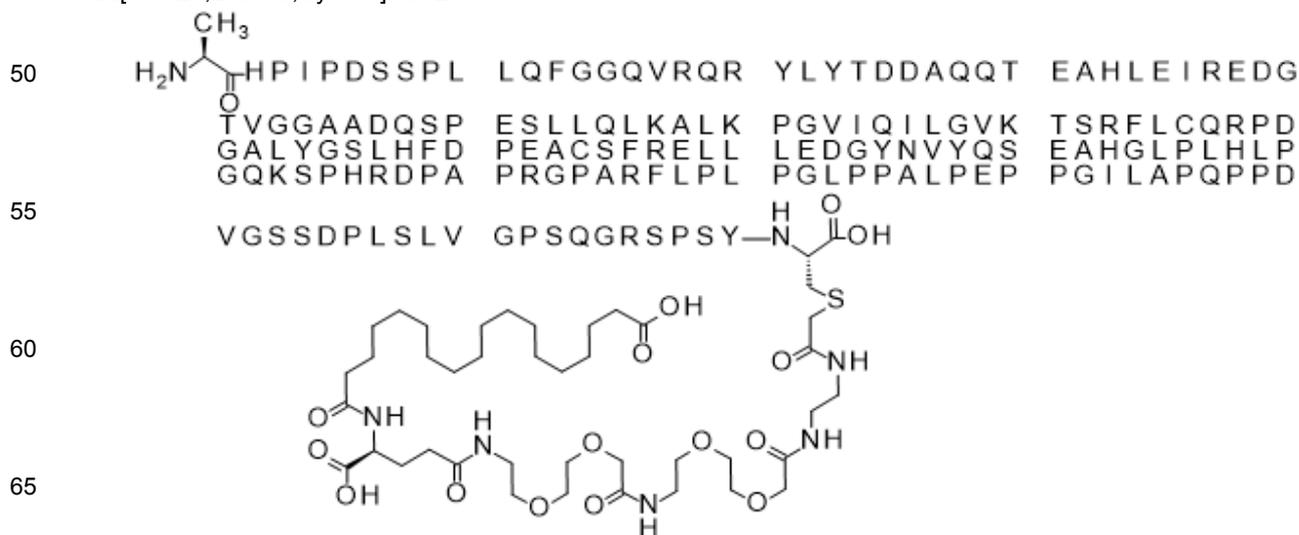
35 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 17-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]heptadecanoico del Ejemplo 4.5.

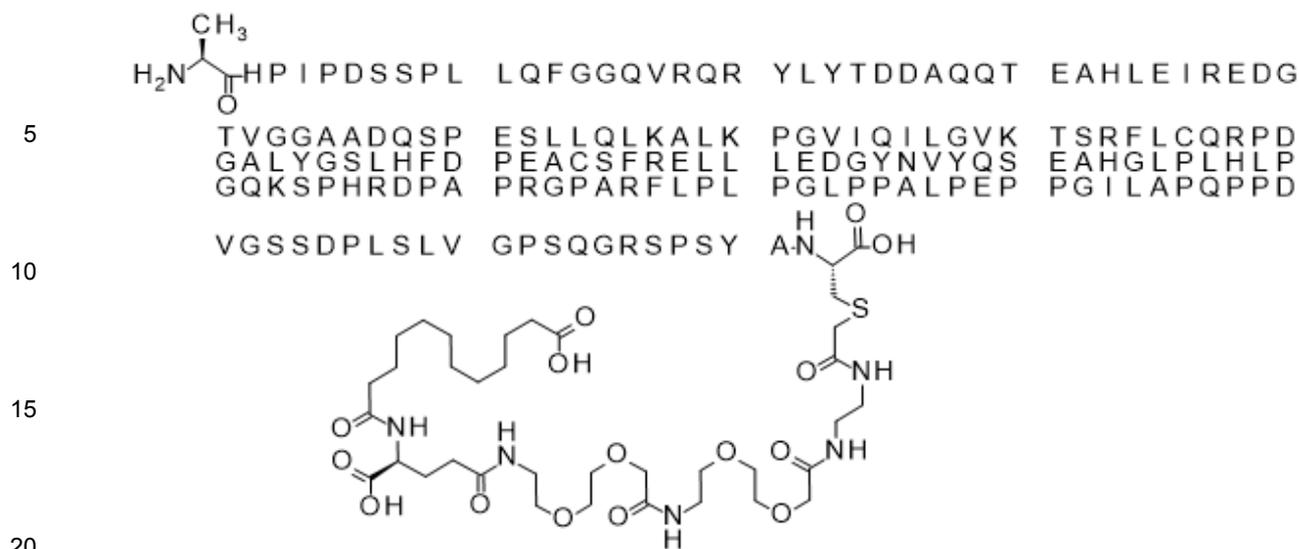
Método de LCMS 3

40 Masa teórica: 20323,9 Encontrado: 20324,5

Ejemplo 5.8: Compuesto 17

45 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21





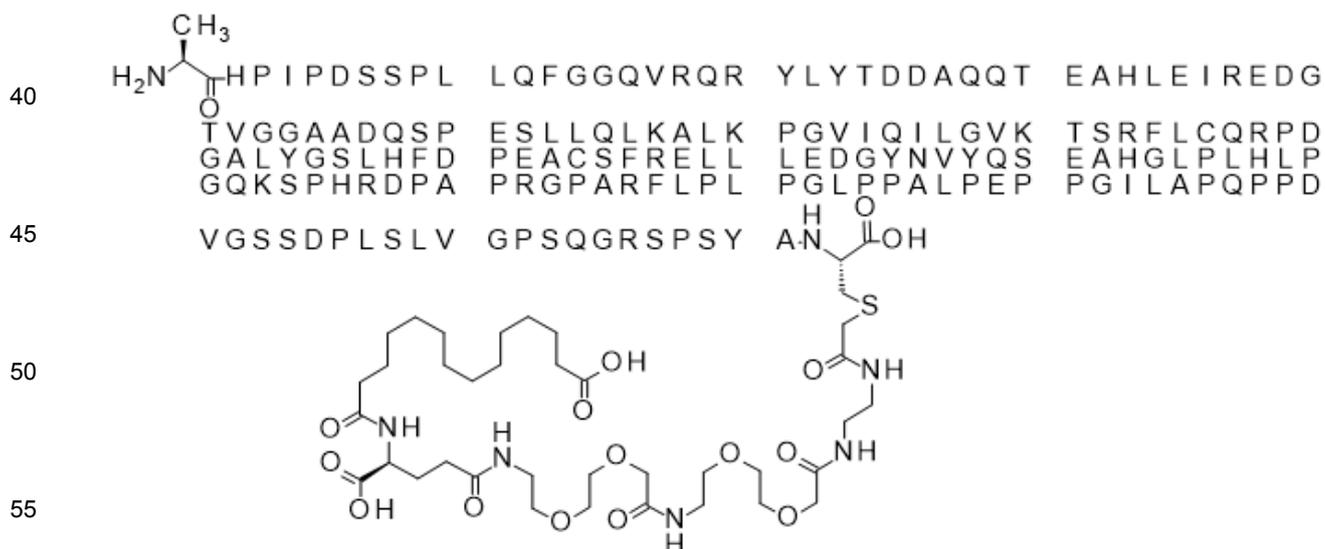
25 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:1 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 11-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoyl]metoxi)-etoxi]etilcarbamoyl]metoxi)etoxi]etilcarbamoyl]propilcarbamoyl]undecanoico del Ejemplo 4.2.

Método de LCMS 2:

Masa teórica: 20223,8; Encontrado: 20224,4.

Ejemplo 5.11: Compuesto 20

35 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



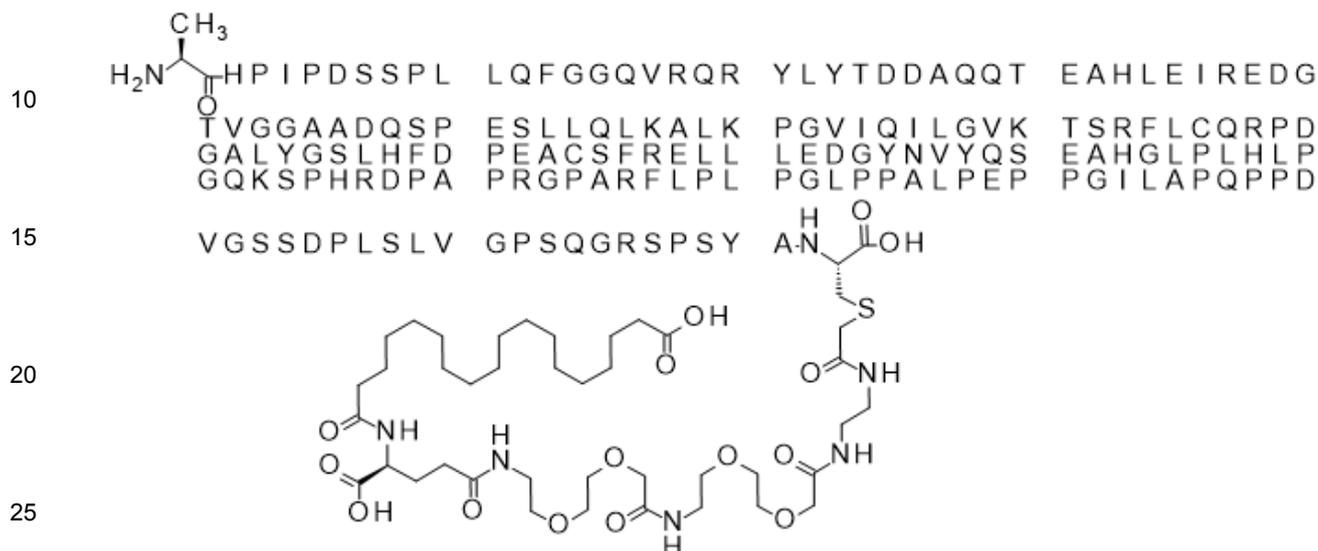
60 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 13-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etil-carbamoyl]metoxi)-etoxi]etilcarbamoyl]metoxi)etoxi]etilcarbamoyl]-propilcarbamoyl]tridecanoico del Ejemplo 4.3.

Método de LCMS 2:

Masa teórica: 20251,8; Encontrado: 20252,2

Ejemplo 5.12: Compuesto 22

S(Beta-181)-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



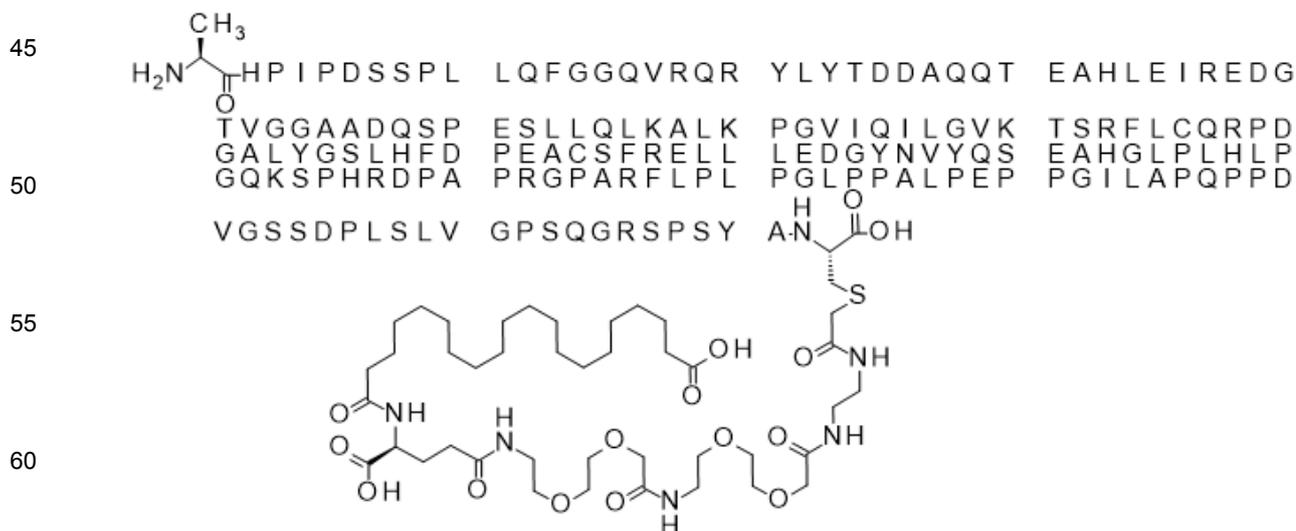
Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 17-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]heptadecanoico del Ejemplo 4.5.

Método de LCMS 2:

Masa teórica: 20307,9 Encontrado: 20308,6.

Ejemplo 5.13: Compuesto 23

S(Beta-181)-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-

bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico del Ejemplo 4.4.

Método de LCMS 2:

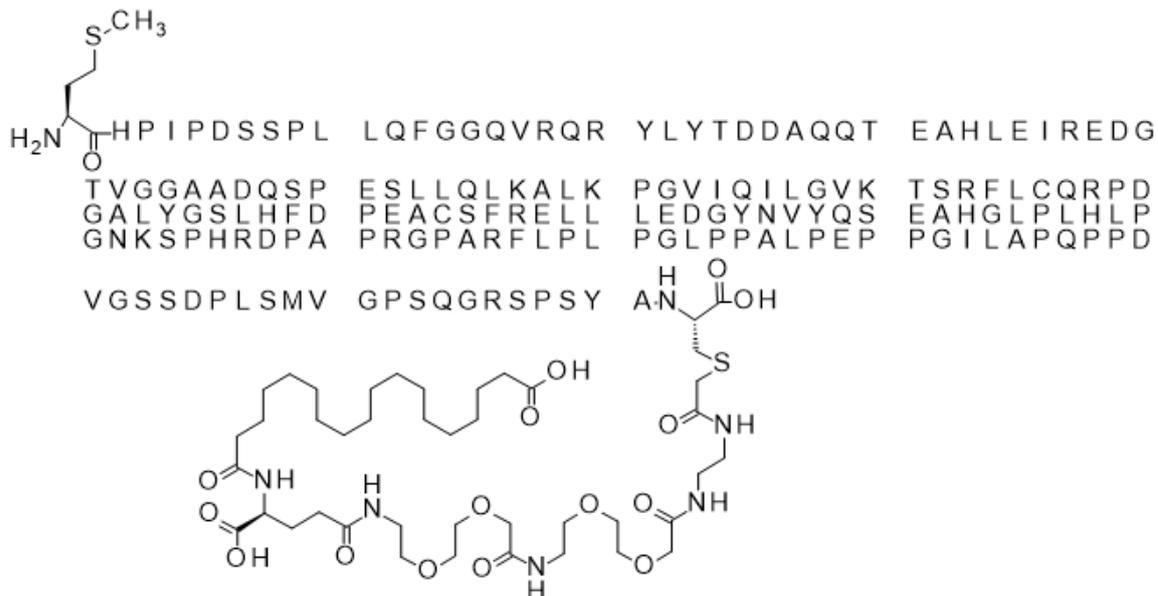
5

Masa teórica: 20336,0 Encontrado: 20336,2

Ejemplo 5.14: Compuesto 24

10 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Met[Cys181]FGF21

15



25

30

35

Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:11 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 17-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)-etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]-metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]heptadecanoico del Ejemplo 4.5.

40

Método de LCMS 3:

Masa teórica: 20372,2 Encontrado: 20372,2.

45 Ejemplo 5.15: Compuesto 34

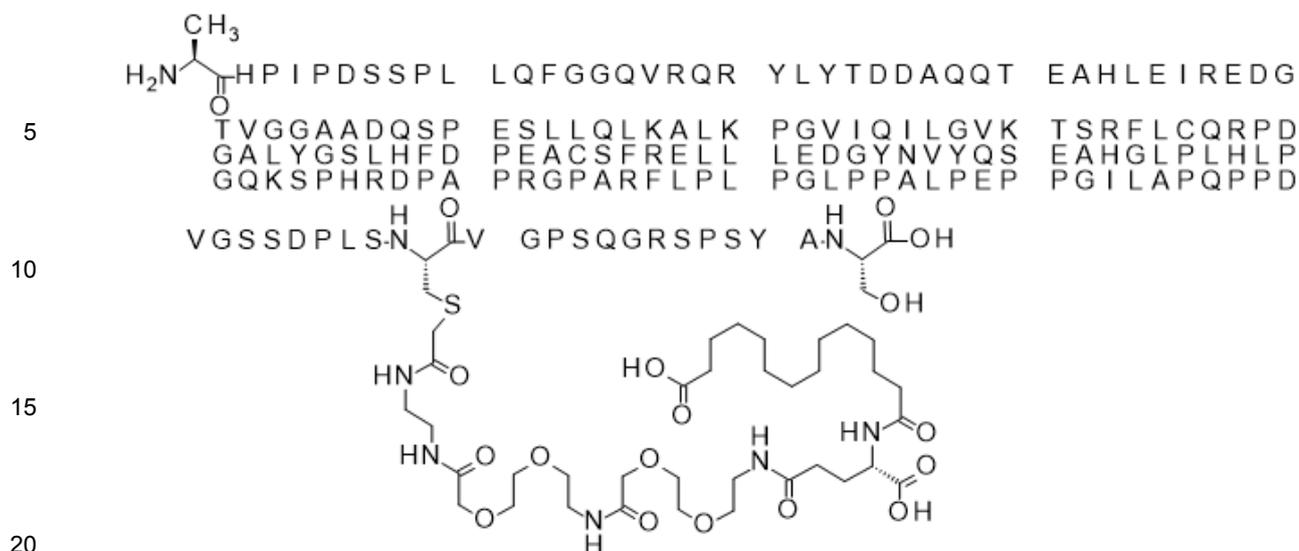
S{Beta-168}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Cys168]FGF21

50

55

60

65



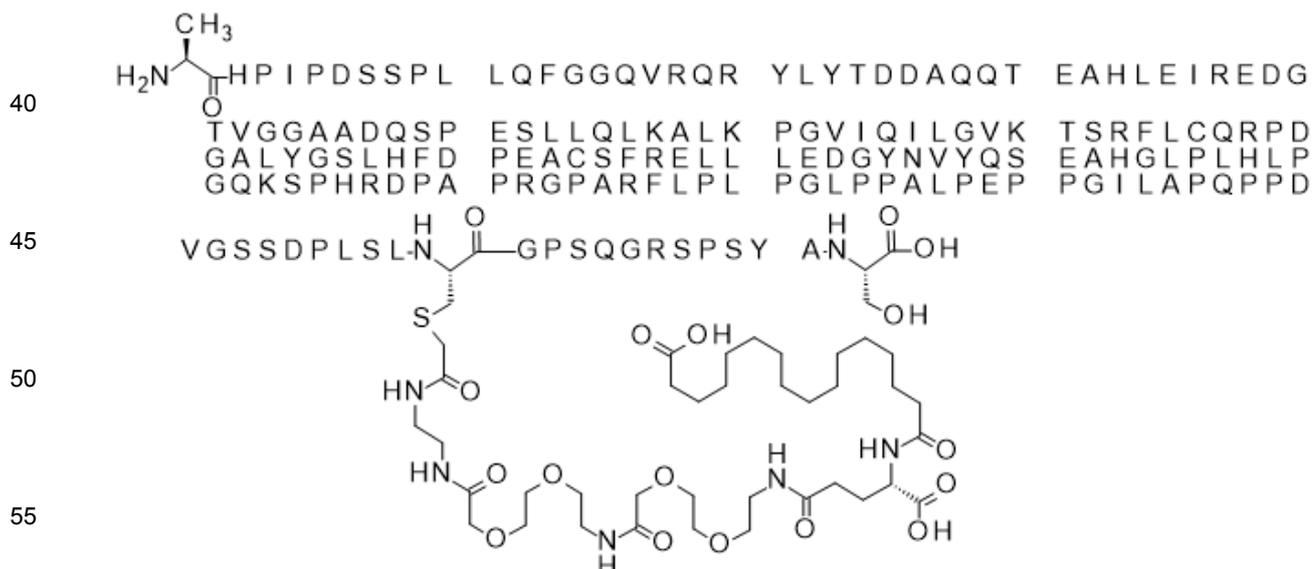
25 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:13 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 13-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoi]metoxi)etoxi]-etilcarbamoi]-metoxi)etoxi)etilcarbamoi]propilcarbamoi]tridecanoico del Ejemplo 4.3.

Método de LCMS 1

Masa teórica: 20225.; Encontrado: 20226,7

Ejemplo 5.16: Compuesto 35

35 S{Beta-169}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4(S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys169]FGF21



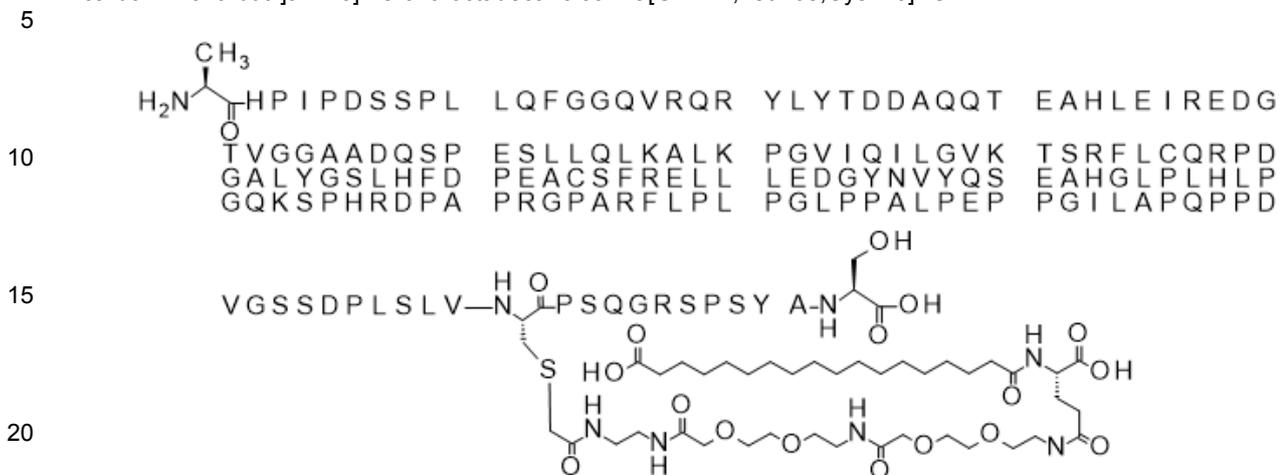
60 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:14 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoi]metoxi)etoxi]etilcarbamoi]-metoxi)etoxi)etilcarbamoi]propilcarbamoi]pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

Método de LCMS 3

Masa teórica: 20267,8; Encontrado: 20268,2

Ejemplo 5.17: Compuesto 36

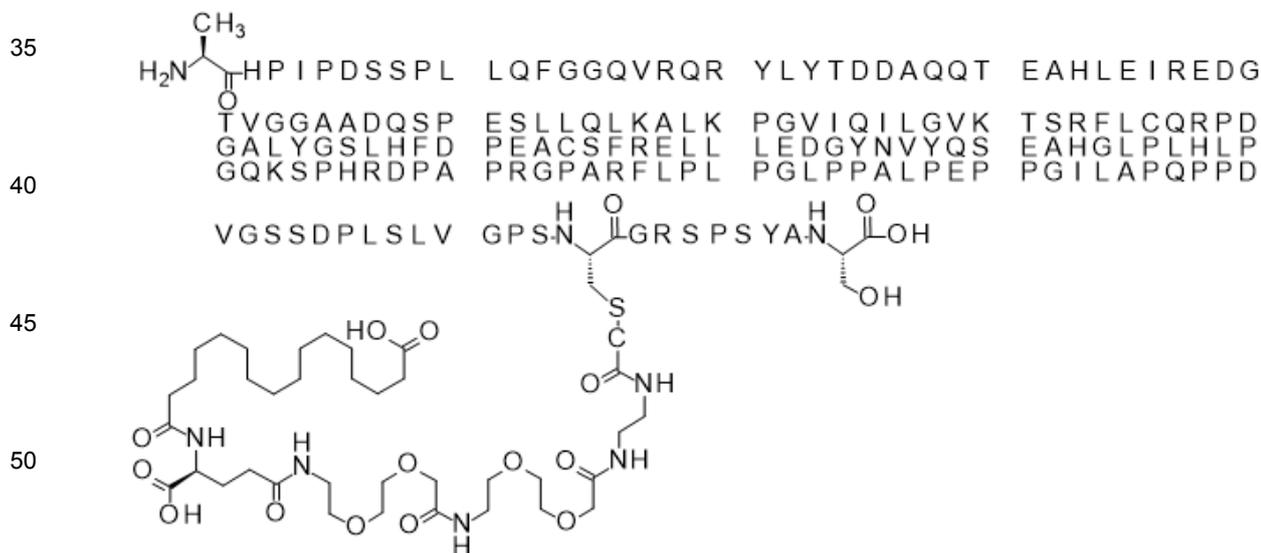
Ácido 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys170]FGF21



25 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:15 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico del ejemplo 4.5.

Ejemplo 5.18: Compuesto 37

30 S{Beta-173}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys173]FGF21



55 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:18 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[(2-bromoacetilamino)etilcarbamoi]metoxi]etoxi)etilcarbamoi]-metoxi]etoxi)etilcarbamoi]propilcarbamoi]pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

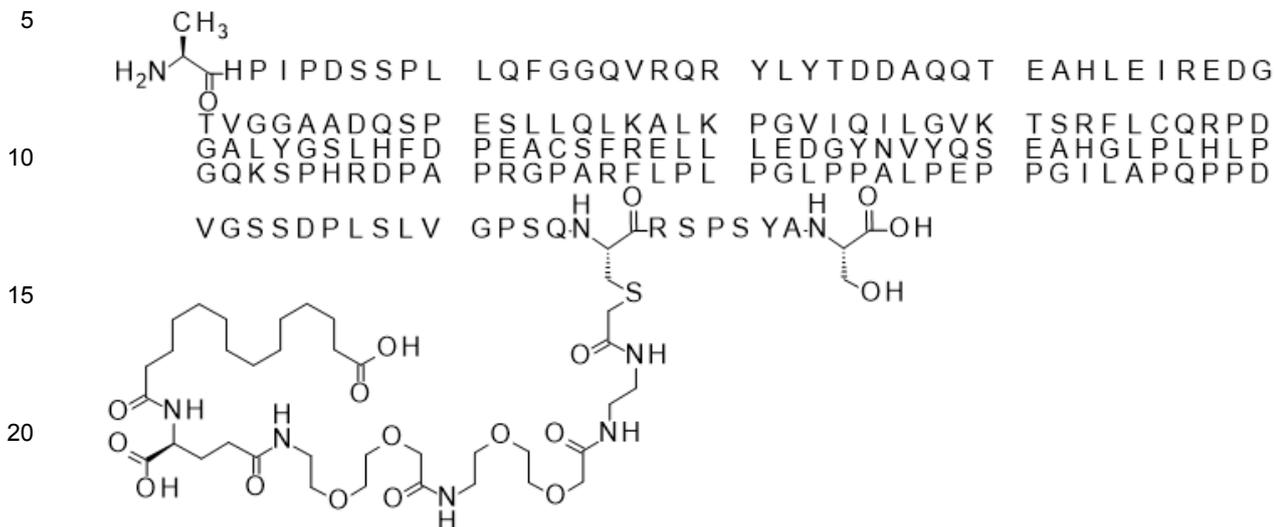
60 Método de LCMS 3

Masa teórica: 20238,8; Encontrado: 20239,3

Ejemplo 5.19: Compuesto 38

65

S{Beta-174}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:19 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 13-{{(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)-etilcarbamoil]-metoxi]etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}tritadecanoico del Ejemplo 4.3.

Método de LCMS 1

Masa teórica: 20281,9 Encontrado: 20281,9

Ejemplo 5.20: Compuesto 39

35

Ácido 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21

40

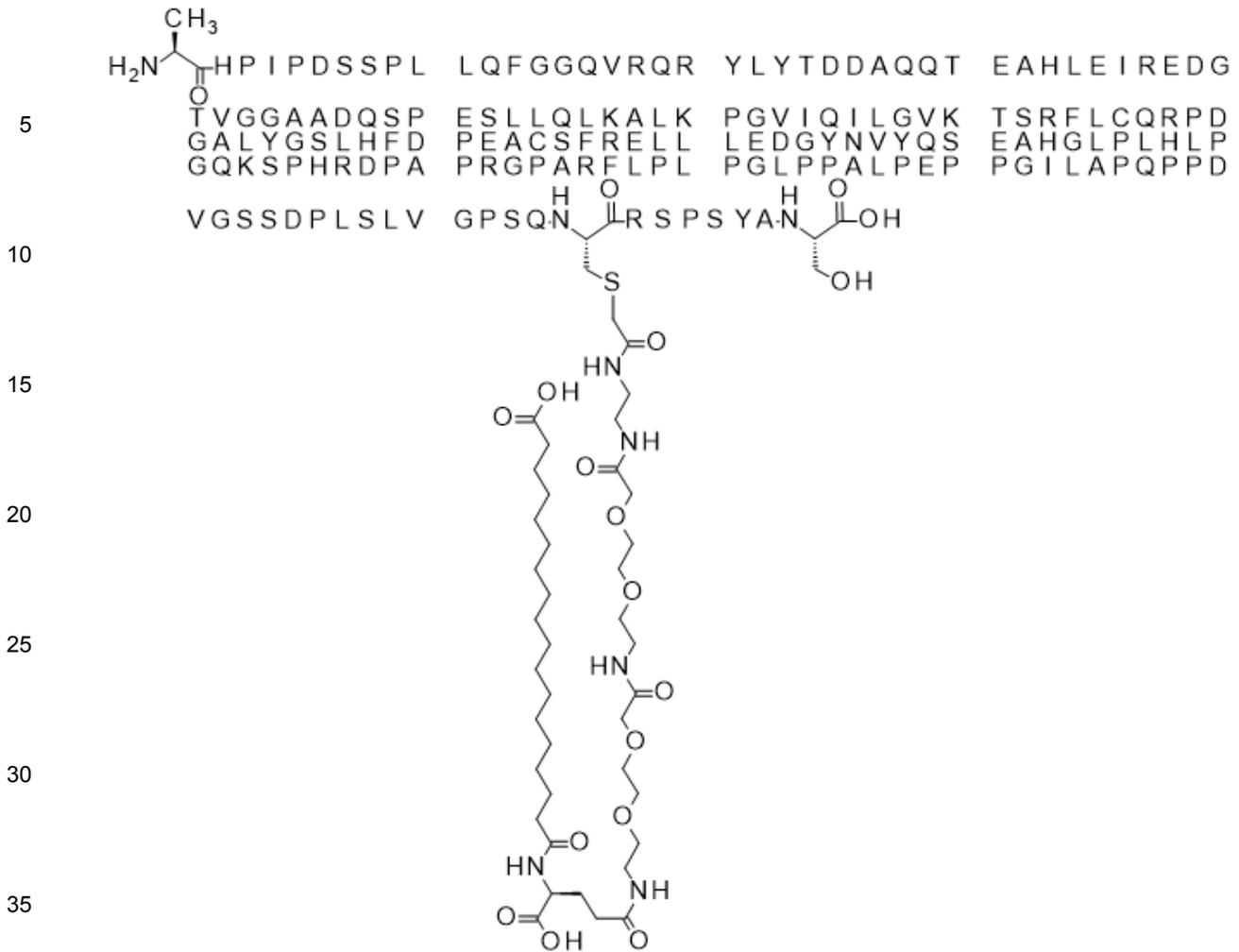
45

50

55

60

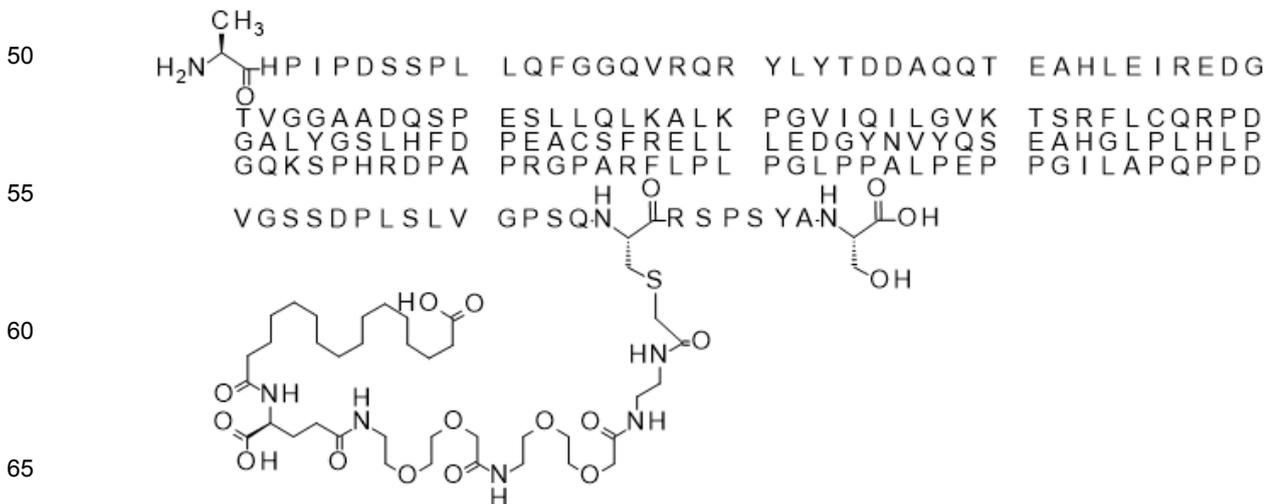
65



40 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO: 19 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 usando el reactivo ácido 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico del ejemplo 4.5

45 Ejemplo 5.21: Compuesto 40

Ácido 16-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-16-oxo-hexadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21



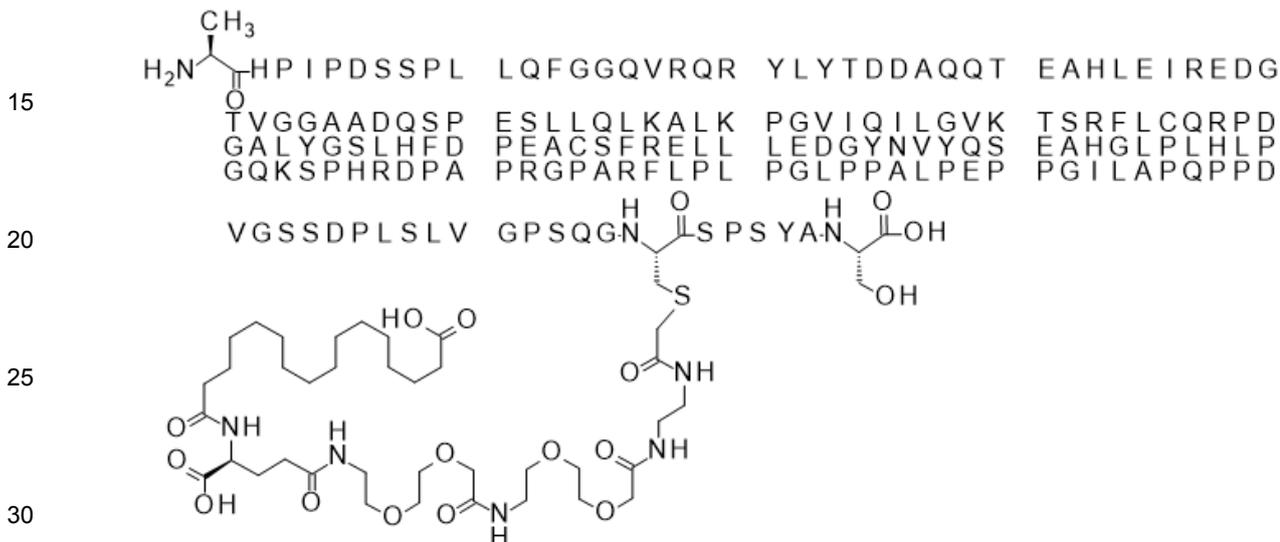
Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO: 19 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 usando el reactivo ácido 16-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-16-oxo-hexadecanoico del ejemplo 4.1

5

Ejemplo 5.22: Compuesto 41

S{Beta-175}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys175]FGF21

10



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:20 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-{2-bromoacetilamino]etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]-propilcarbamoil]pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

35

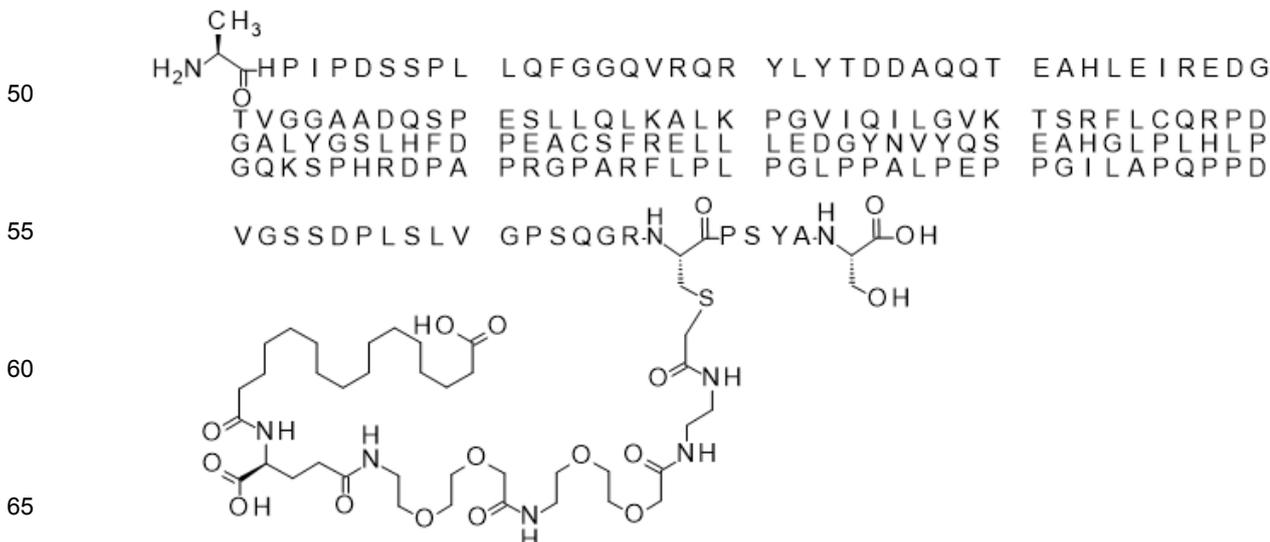
Método de LCMS 3

40 Masa teórica: 20210,8; Encontrado: 20211,4

Ejemplo 5.23: Compuesto 42

S{Beta-176}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21

45



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:4 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 15-((S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]-metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}pentadecanoico del Ejemplo 4.1.

5

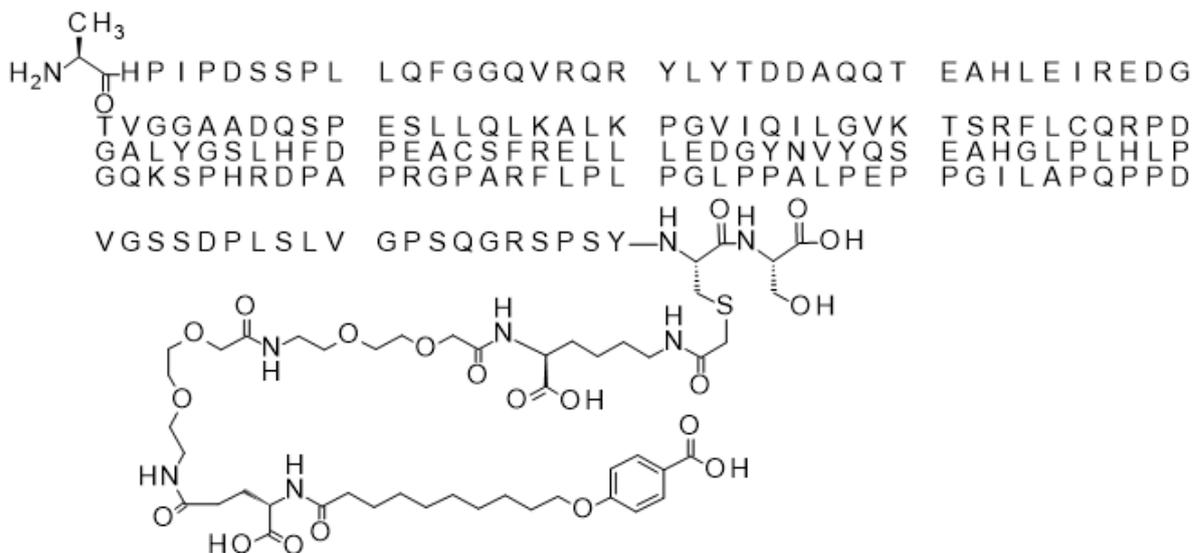
Método de LCMS 3

Masa teórica: 20279,9; Encontrado: 20280,4

10 Ejemplo 5.24: Compuesto 43

Ácido 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

15



20

25

30

35

Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]benzoico del Ejemplo 4.11.

40

Ejemplo 5.25: Compuesto 44

Ácido 4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

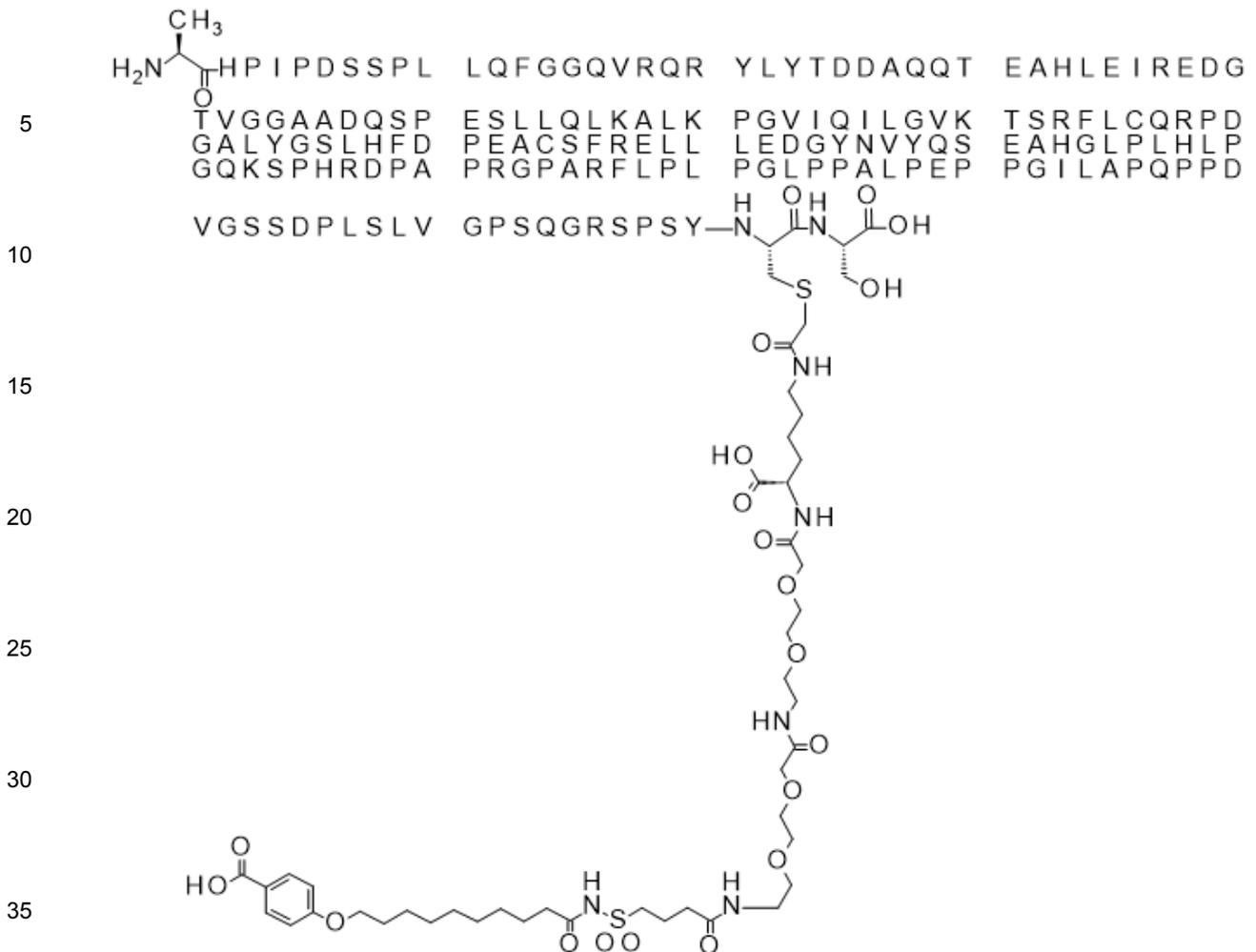
45

50

55

60

65



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]benzoico del Ejemplo 4.10.

Ejemplo 5.26: Compuesto 45

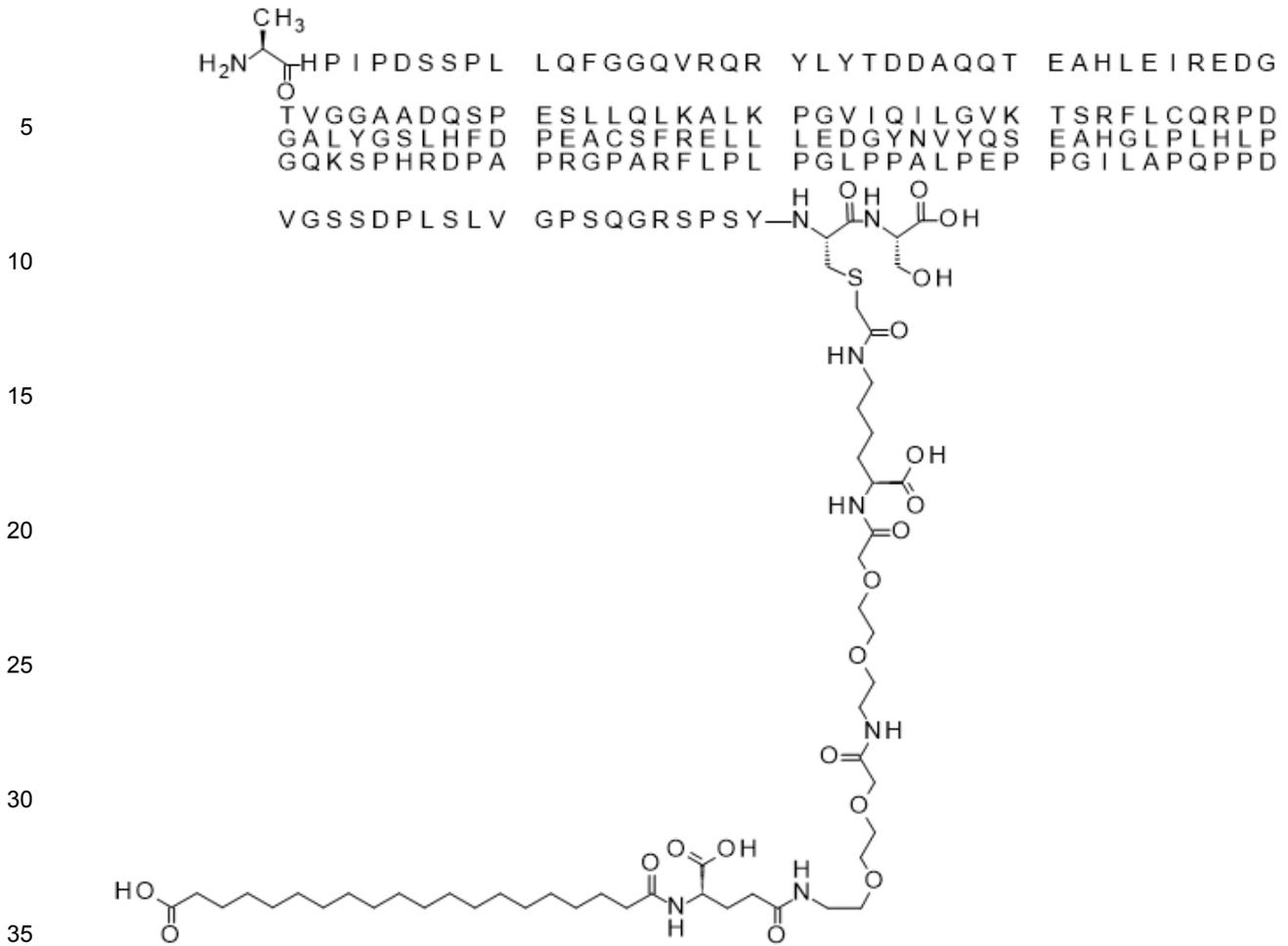
45 Ácido 20-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-20-oxo-icosanoico Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

50

55

60

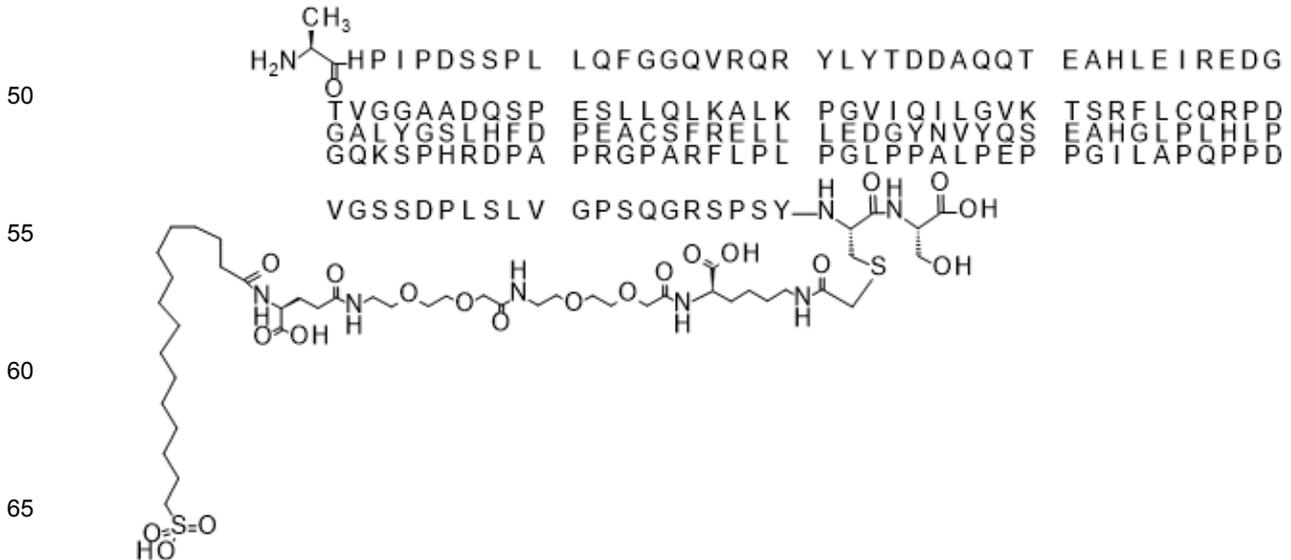
65



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 20-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-20-oxo-icosanoico del ejemplo 4.13.

Ejemplo 5.28: Compuesto 47

Ácido (2S)-6-acetamido-2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



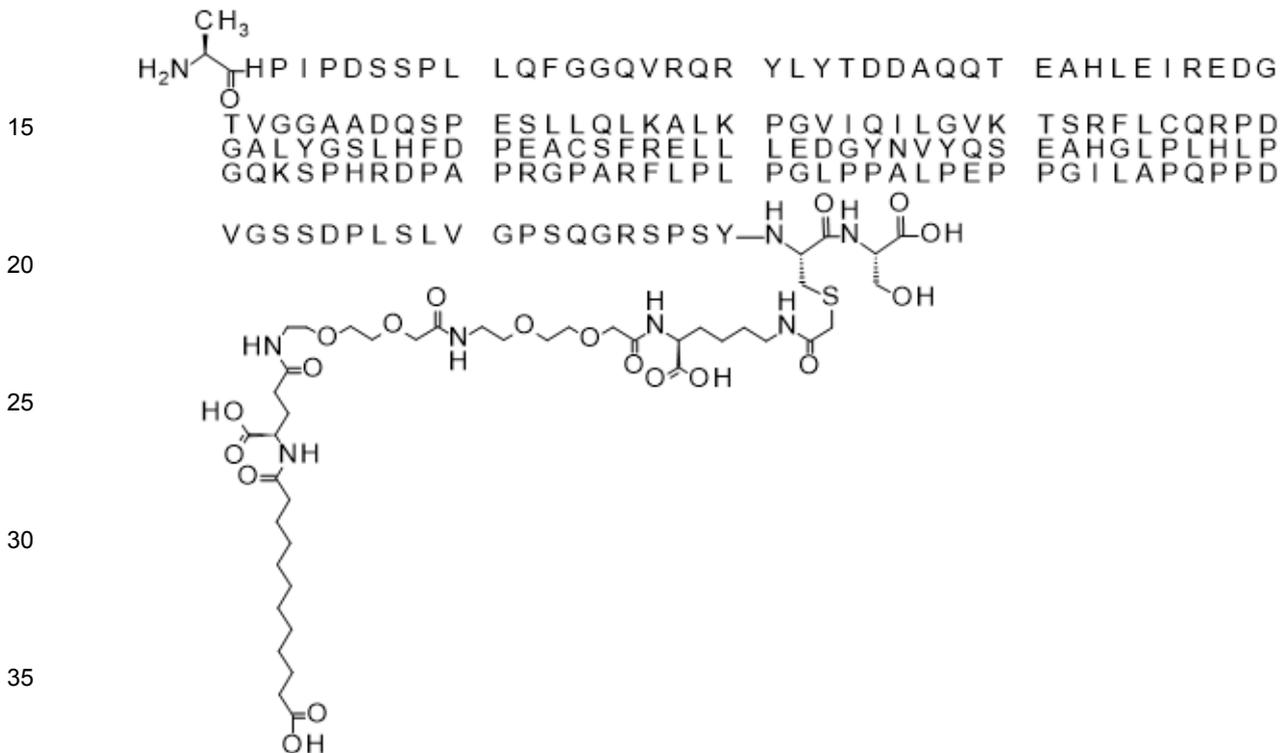
Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido (2S)-6-[(2-bromoacetil)amino]-2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoico del ejemplo 4.14.

5

Ejemplo 5.29: Compuesto 48

Ácido 12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

10



25

Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico del ejemplo 4.16.

Ejemplo 5.30: Compuesto 49

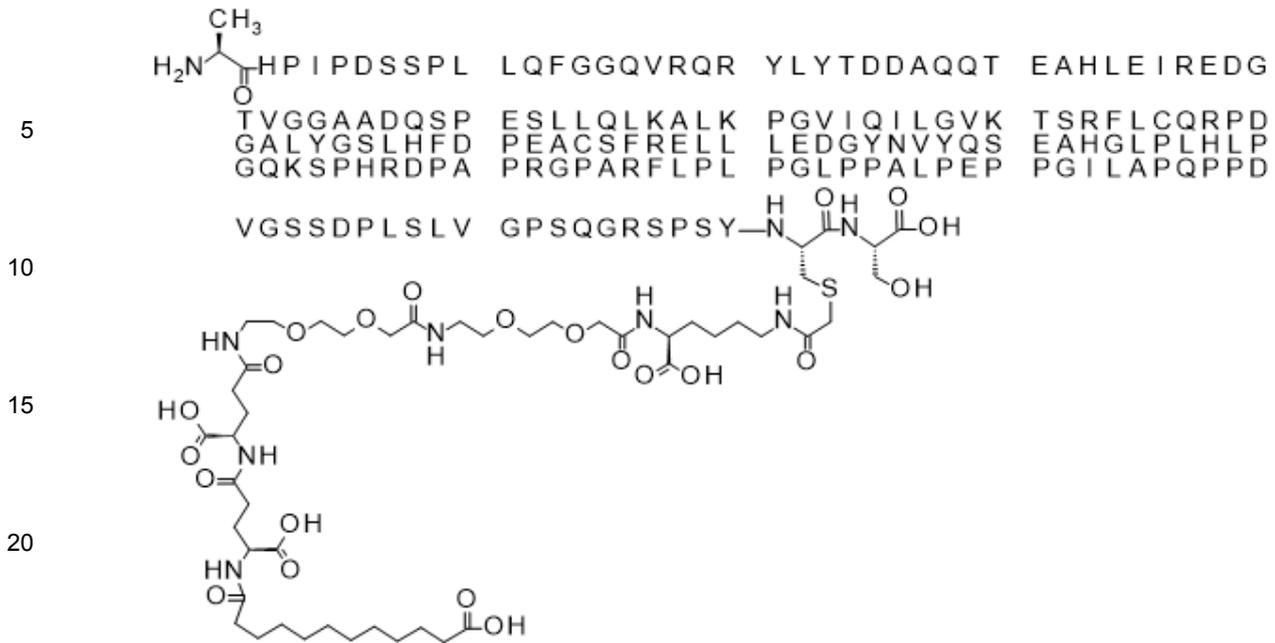
Ácido 12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

50

55

60

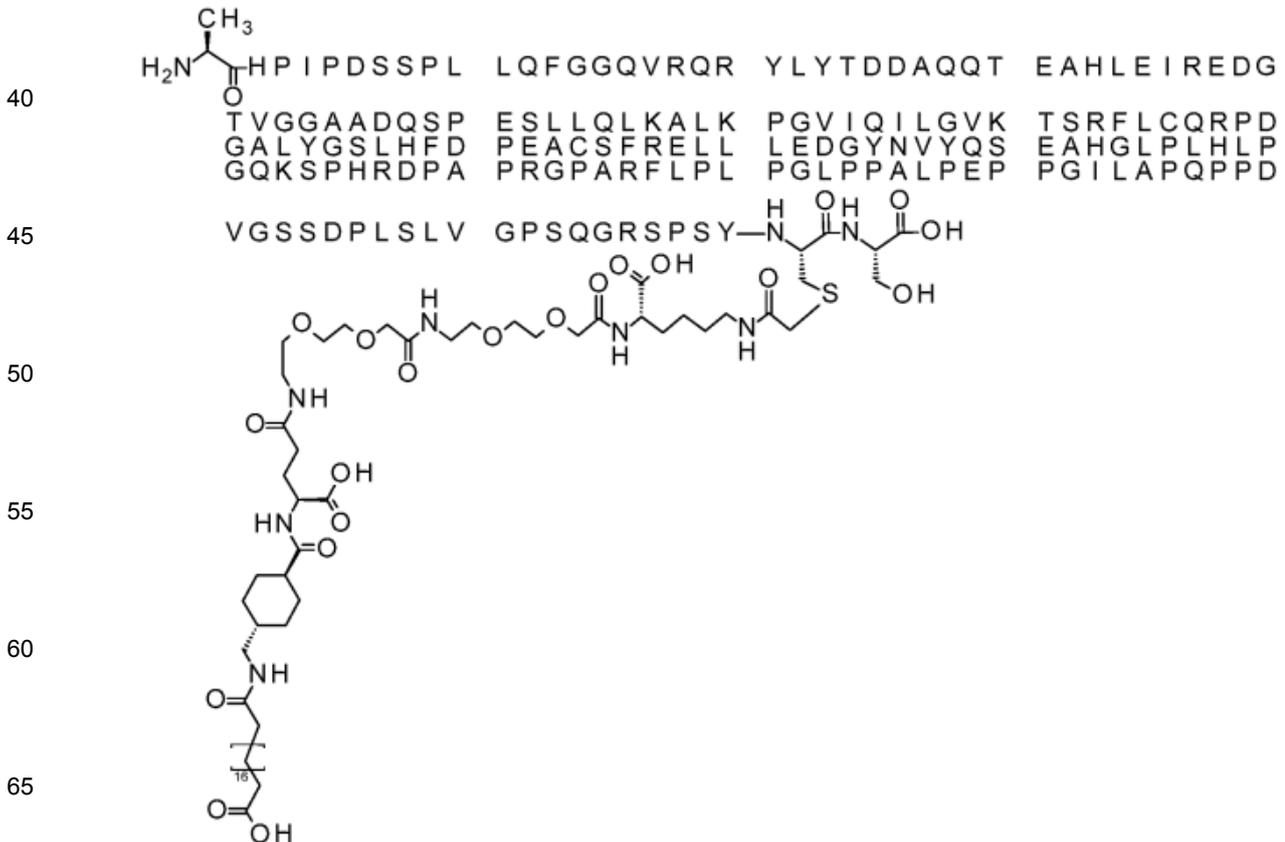
65



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico del ejemplo 4.15.

Ejemplo 5.31: Compuesto 50

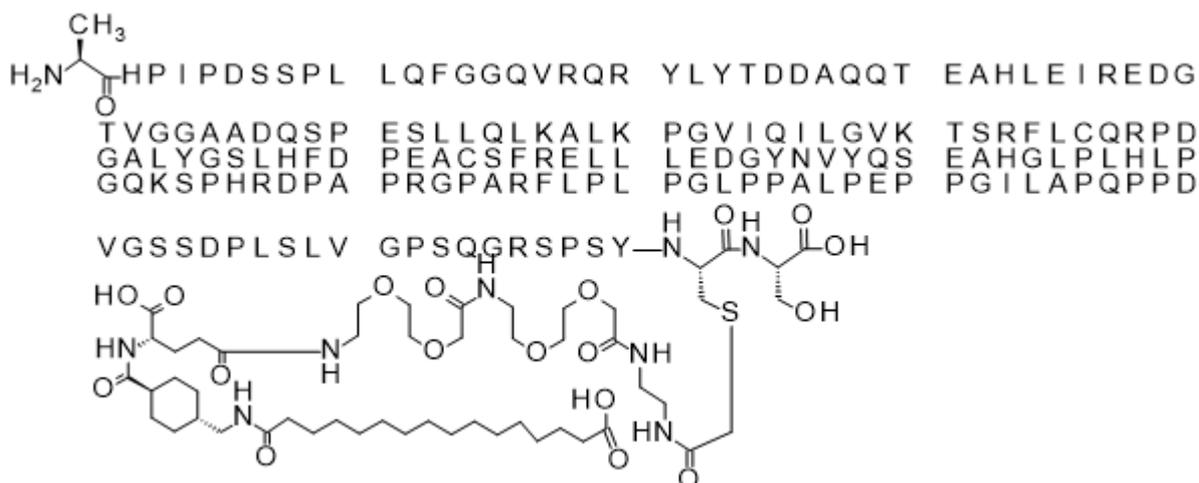
Ácido 20-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-acetamido)-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-20-oxo-icosanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 20-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-20-oxo-icosanoico del ejemplo 4.17.

Ejemplo 5.32: Compuesto 51

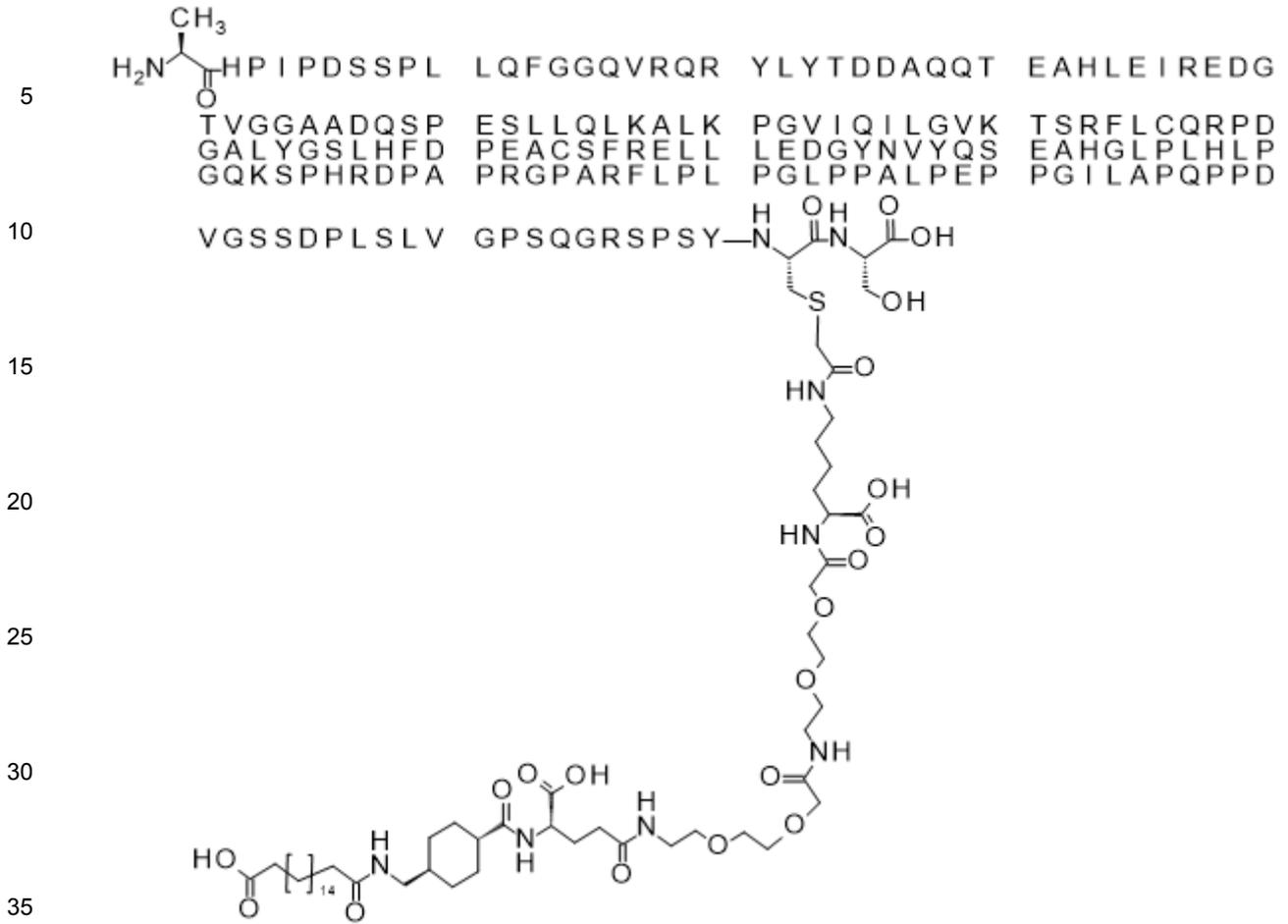
Ácido 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-16-oxo-hexadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-acetamido)-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-16-oxo-hexadecanoico del ejemplo 4.7.

Ejemplo 5.33: Compuesto 52

Ácido 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-acetamido)-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-16-oxo-hexadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

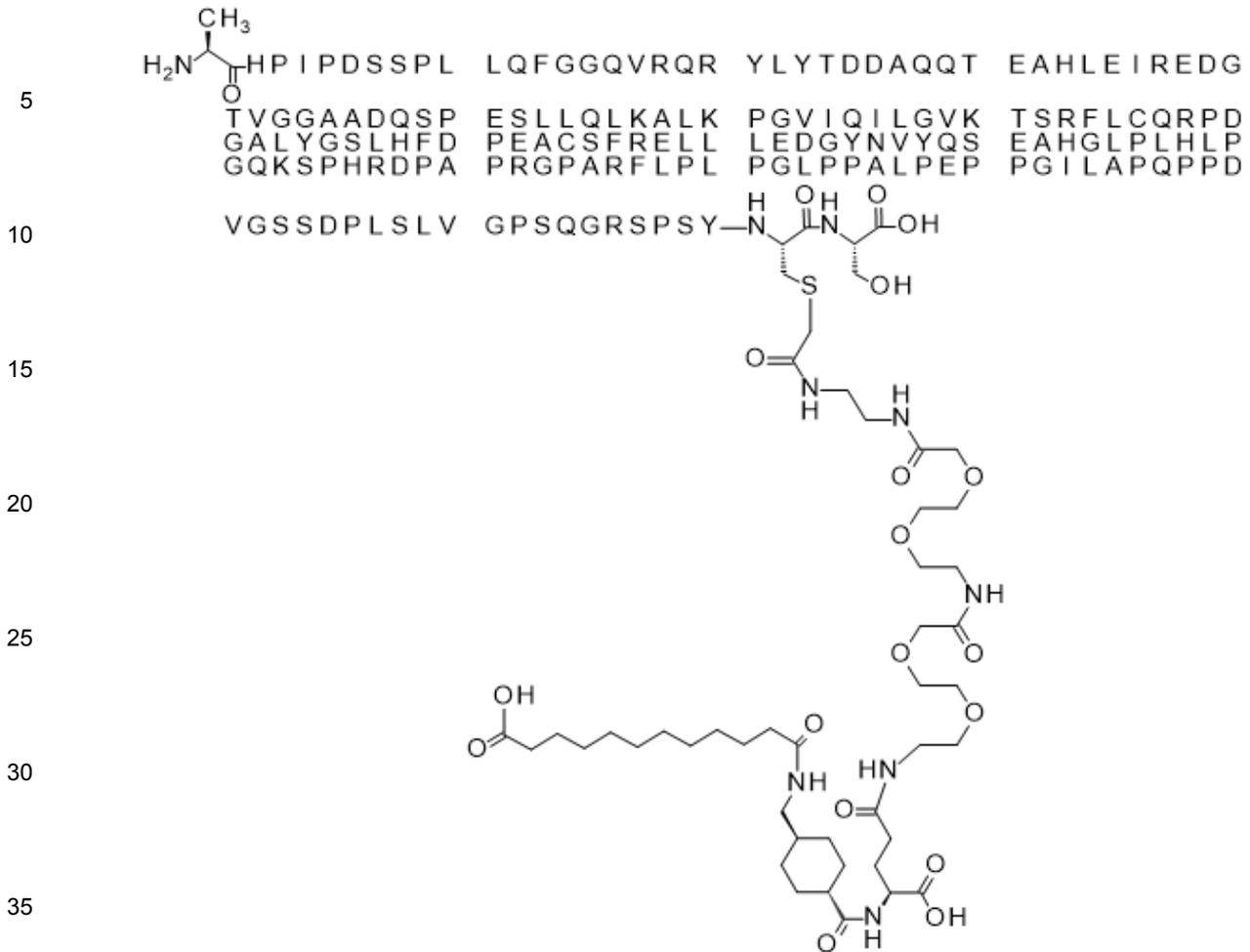


Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 18-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-18-oxo-octadecanoico del ejemplo 4.8.

Ejemplo 5.35: Compuesto 54

Ácido 12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-12-oxo-dodecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

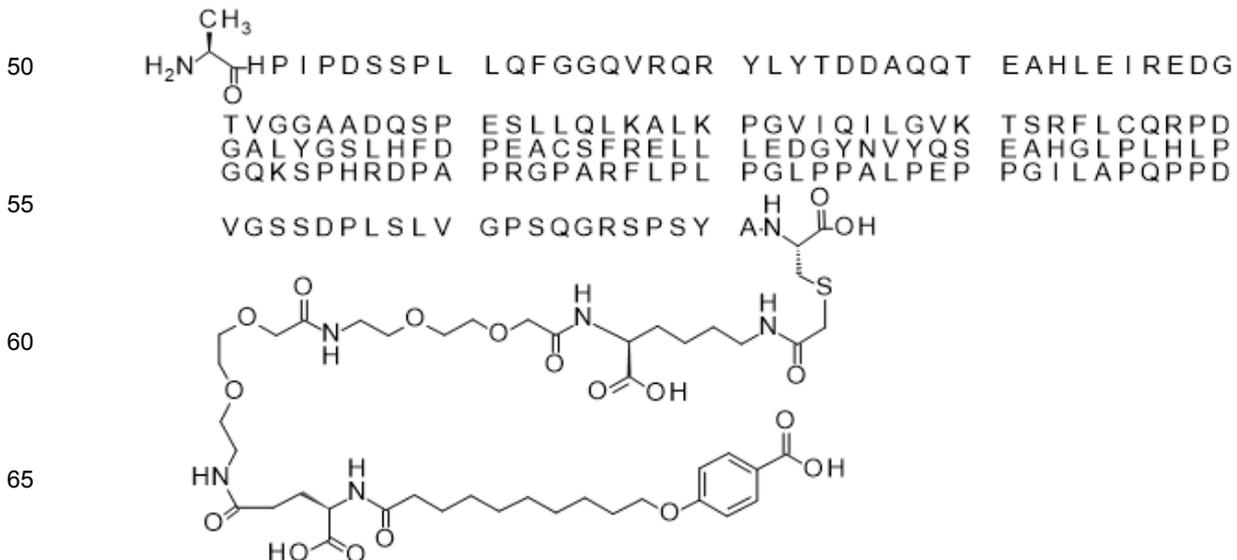
50
55
60
65



40 Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:8 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butyl]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-12-oxo-dodecanoico del ejemplo 4.6.

45 Ejemplo 5.36: Compuesto 55

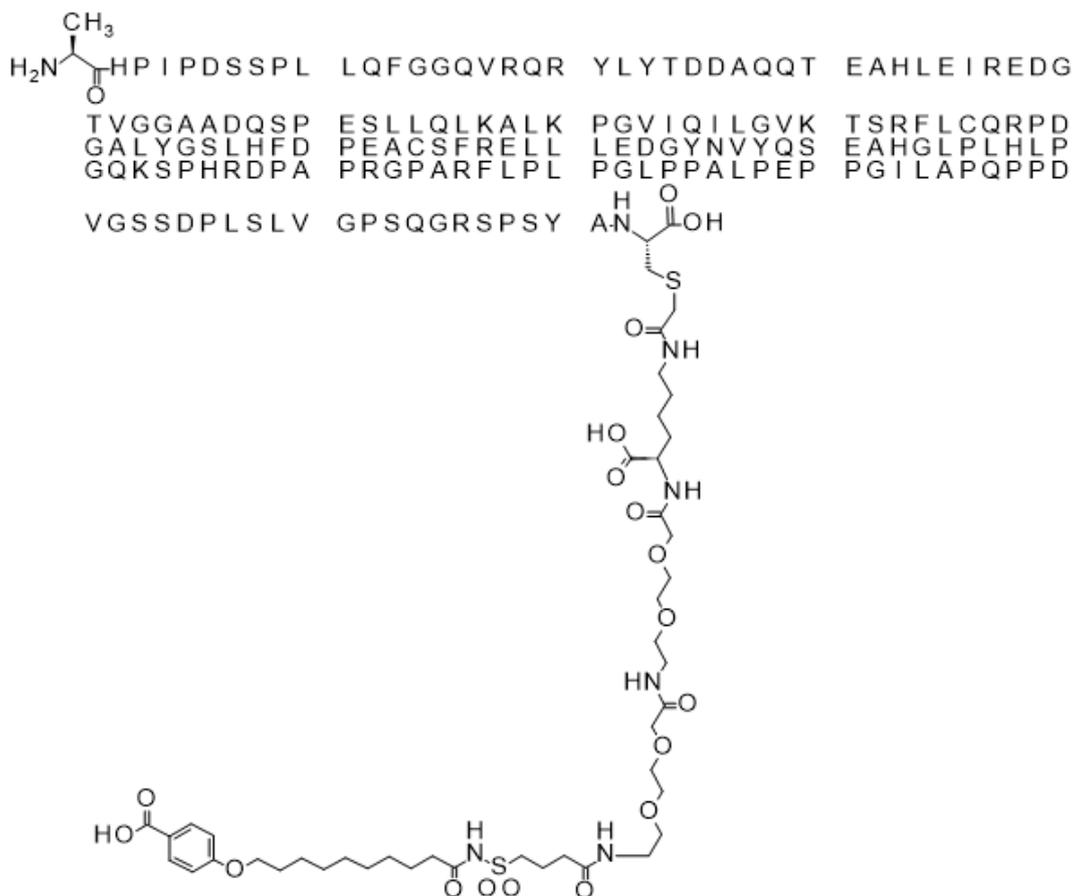
4-[[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butyl]amino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver ejemplo 3) preparado mediante el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]benzoico del Ejemplo 4.11.

Ejemplo 5.37: Compuesto 56

4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



Este compuesto es un derivado del análogo de FGF21 de la SEQ ID NO:10 (ver el ejemplo 3) preparado por el método descrito en el Ejemplo 5.1 mediante el uso del reactivo ácido 4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]benzoico del Ejemplo 4.10.

Métodos farmacológicos

La utilidad de los análogos de FGF21 o sus derivados de la presente invención como agentes farmacéuticamente activos en la reducción de la ganancia de peso y el tratamiento de la obesidad y la diabetes en mamíferos (tales como seres humanos) puede demostrarse mediante la actividad de los agonistas de FGF21 en ensayos convencionales y en los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación.

Tales ensayos proporcionan además un medio por el cual las actividades de los compuestos de FGF21 de esta invención pueden compararse con las actividades de compuestos conocidos.

Ejemplo 6: Potencia del receptor de FGF en un ensayo de fosforilación de Erk en HEK293 que sobreexpresan el BKL humano

El propósito de este ejemplo es probar la actividad, o potencia, de los derivados de FGF21 *in vitro*. La potencia *in vitro* es la medida de la activación del receptor de FGF en un ensayo de células completas.

Las potencias de los derivados de FGF21 del Ejemplo 5 se determinaron en HEK (células renales embrionarias humanas) que sobreexpresan beta-klotto humano (BKL) como se describe adicionalmente a continuación.

5 Para probar la unión de los derivados de FGF21 a la albúmina, el ensayo se realizó en ausencia de albúmina de suero así como también en presencia de albúmina de suero humano (HSA) (concentración de ensayo final de 0,1 %). Un aumento en el valor de EC50 (disminución de la potencia) en presencia de albúmina de suero para los derivados de FGF21 indicaría la unión a la albúmina de suero y representa un método para predecir un perfil farmacocinético prolongado de la sustancia de prueba en modelos animales.

10 Los resultados para los análogos de FGF21 se muestran en la Tabla 2 y los resultados para los derivados de FGF21 se muestran en la Tabla 3. MetFGF21 (SEQ ID NO:2) se incluye como referencia.

Principio del ensayo

15 Las células HEK293 expresan endógenamente varios receptores de FGF, que incluyen FGFR1c, FGFR3c y FGFR4. Estas células no responden a FGF21 hasta transfectadas con el correceptor beta-klotto (BKL). La activación del complejo receptor de FGF/BKL conduce a la activación de la vía de señalización MAPK/ERK y la fosforilación de ERK. El nivel de ERK fosforilado (pERK) en un punto de tiempo dado aumenta con concentraciones crecientes de FGF21. Como se describe a continuación el nivel de pERK se mide después de 12 minutos de estimulación con un intervalo de concentraciones de análogos de FGF21.

Descripción del ensayo

25 Las células HEK293/beta-klotto se siembran con 30 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1), suplementado con FCS al 10 % (Gibco #16140-071), 1 % de penicilina/estreptomina (Gibco #15140), 100 µg/ml de Higromicina B, (Calbiochem, # 400052). Dos días más tarde y 2 horas antes de la adición del compuesto, el medio celular se cambia con 100 µl de medio basal (DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1)). Los análogos de FGF21 se diluyen en medio de ensayo (DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1) suplementado con 0,02 % de Tween20), se calientan a 37 °C, se añaden a las células (100 µl) y se incubaron a 37 °C durante 12 minutos.

30 Los derivados de FGF21 también se probaron en presencia de 0,1 % de HSA (Sigma – A1887). Todos los medios se extraen rápidamente y se añade un tampón de lisis 50 µl por pocillo. La placa se agita durante 5 minutos y el lisado está listo para la medición de pERK. pERK se mide en placas de 384 pocillos con el kit AlphaScreen SureFire (PerkinElmer #TGRES10K). Este kit se basa en anticuerpos específicos ERK y pERK acoplados a perlas donantes y aceptoras. La presencia de pERK traerá perlas aceptoras y donantes en estrecha proximidad y se genera una señal que se lee en EnVision. Los datos se analizan mediante el uso de GraphPad Prism y la potencia de las proteínas FGF21 se describe como el valor de EC₅₀ absoluto.

Tabla 2A. Potencia de análogos de FGF21 en células HEK293/BKL

Compuesto	Nombre del compuesto	EC50 (nM)
1	MetFGF21	1,8
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	2,0
3	S{Beta-176}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	227
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	416
5	S{Beta-178}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	105
6	S{Beta-179}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	69
7	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	2,3
8	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	20
9	S{Beta-181}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	27

60 Como puede observarse a partir de los resultados en la Tabla 2, la introducción de una cisteína en las posiciones 176, 177, 178 o 179 disminuye dramáticamente la potencia en comparación con MetFGF21. Sorprendentemente, sin embargo, la introducción de una cisteína en la posición 180 o en la posición 181 no conduce a una reducción de la potencia (180C) o reducción modesta (181C) en comparación con MetFGF21. El Compuesto 7, con una cisteína en la posición 180, muestra una potencia similar a MetFGF21 y el Compuesto 2 que tiene los mismos cambios de aminoácidos que el Compuesto 8, excepto por la cisteína en la posición 180.

La potencia del Compuesto 9 con una cisteína en la posición 181 solo disminuye ligeramente en comparación con MetFGF21 y también con el Compuesto 2 que tiene los mismos cambios de aminoácidos que el Compuesto 9, excepto por la cisteína en la posición 181.

5 Tabla 2B. Potencia de análogos de FGF21 adicionales en células HEK293/BKL

Compuesto	Nombre del compuesto	EC50 (nM)
25	Ala[Gln121,Cys167,Leu168,]FGF21	4
26	Ala[Gln121,Cys168]FGF21	492
27	Ala[Gln121,Leu168,Cys169]FGF21	22
28	Ala[Gln121,Leu168,Cys170]FGF21	7
29	Ala[Gln121,Leu168,Cys171]FGF21	8
30	Ala[Gln121,Leu168,Cys172]FGF21	5
31	Ala[Gln121,Leu168,Cys173]FGF21	4
32	Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21	5
33	Ala[Gln121,Leu168,Cys175]FGF21	11

Puede observarse que el compuesto #26 con una sustitución de aminoácidos C168 tiene potencia reducida, mientras que los análogos con una cisteína en la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174 y 175 sorprendentemente tienen potencias similares a MetFGF21.

25 Tabla 3A. Potencia de derivados de FGF21 en células HEK293/BKL en ausencia o presencia de HSA al 0,1 %.

Compuesto	Cadena principal de proteínas	Elemento prolongador	EC50 (nM)	EC50 (HSA al 0,1 %) (nM)
11	Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	Diácido C16	167	137
12	Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	Diácido C16	107	134
13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C12	7	4
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C14	6	6
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C16	4	6
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C18	5	48
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C20	5	133
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	Diácido C18	8	20
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C12	154	137
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C14	58	41
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C16	55	72
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C18	42	170
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C20	58	434
24	Met[Cys181]FGF21	Diácido C18	16	71

50 Como puede observarse a partir de los resultados en la Tabla 3A, se encontró sorprendentemente que la unión de una cadena lateral de la presente invención a la cisteína en cualquiera de las posiciones 178-181 no conduce a una disminución de la potencia en comparación con los compuestos sin una cadena lateral (ver Tabla 2). Los compuestos 11, 12, 15 y 21 todos comprenden una cadena lateral idéntica en donde el elemento prolongador es el diácido C16 (Químico 1a) (los elementos enlazadores son un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3a, y un elemento de Químico 4a). Cuando se comparan con las potencias de los análogos de FGF21 correspondientes (Compuestos 5, 6, 7 y 9, ver tabla 2), puede observarse que las potencias de estos derivados de FGF21 son similares a los análogos de FGF correspondientes (es decir que no tienen cadena lateral).

60 También se exploró el efecto sobre la potencia de los compuestos que tienen elementos prolongadores de longitud variable de la cadena de ácido graso. Las potencias de los derivados de FGF con una cisteína en la posición 180 fueron similares para los derivados de FGF21 que tienen un diácido C12, un diácido C14, un diácido C16 o un diácido C18 como elemento prolongador en ausencia de HSA. Las potencias de los derivados de FGF con una cisteína en la posición 181 fueron similares para los derivados de FGF21 que tienen un diácido C14, un diácido C16, un diácido C18 o un diácido C20 como elemento prolongador en ausencia de HSA.

El aumento de la concentración de HSA no tiene efecto o tiene un efecto modesto sobre la potencia de los derivados que comprenden una cadena lateral C12, C14 o C16, mientras que la potencia de los compuestos con una cadena lateral C18 o C20 tiene una potencia reducida en presencia de HAS al 0,1 %.

5 Como puede observarse en la Tabla 3A, el aumento del valor EC50 en presencia de albúmina de suero al 0,1 % en comparación con el valor de EC50 sin albúmina de suero para los derivados de FGF21 corresponde con la longitud creciente del prolongador. Esto se corresponde bien con un aumento de la vida media para estos derivados de FGF21 (ver el Ejemplo 8).

10 Tabla 3B. Potencia de derivados de FGF21 adicionales en células HEK293/BKL en ausencia o presencia de HSA al 0,1 %.

Compuesto	Cadena principal de proteínas	Elemento prolongador	EC50 (nM)	EC50 (HSA al 0,1 %) (nM)
15 34	-1A, 121Q, 168C	Diácido C14	667	4264
35	-1A, 121Q, 168L, 169C	Diácido C16	25	20
36	-1A, 121Q, 168L, 170C	Diácido C18	1	20
20 37	-1A, 121Q, 168L, 173C	Diácido C16	3	4
38	-1A, 121Q, 168L, 174C	Diácido C14	4	4
39	-1A, 121Q, 168L, 174C	Diácido C18	1	1
40	-1A, 121Q, 168L, 174C	Diácido C16	2	4
25 41	-1A, 121Q, 168L, 175C	Diácido C16	1	1
42	-1A, 121Q, 168L, 176C	Diácido C16	214	373

30 La potencia de los derivados de FGF21 con diferentes cadenas principales FGF21 como se describió anteriormente se probó adicionalmente y se encontró que los derivados con la cisteína en la posición 169, 170, 171, 172, 173, 174 y 175 mantuvieron la potencia cuando se derivaron con un prolongador de ácido graso. Se observa que la derivatización en la Cys 169 reduce ligeramente la potencia.

35 Tabla 3C. Potencia de derivados de FGF21 adicionales en células HEK293/BKL en ausencia o presencia de HSA al 0,1 %.

Compuesto	Cadena principal de proteínas	Elemento prolongador	EC50 (nM)	EC50 (HSA al 0,1 %) (nM)
40 43	-1A, 121Q, 168L, 180C	4-COOH-PhO-C10	5,0	3
44	-1A, 121Q, 168L, 180C	4-COOH-PhO-C10	3,2	4
45 45	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C20	10,3	65,5
46	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C20	6,1	52,5
45 47	-1A, 121Q, 168L, 180C	ácido sulfónico C16	4,2	7,1
48	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C12	8,4	3,4
50 50	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C12	7,9	6,1
50 50	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C20	4,0	35,5
50 51	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C16	3,5	3,2
52	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C16	4,0	2,1
53	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C18	4,0	14,0
55 54	-1A, 121Q, 168L, 180C	Diácido C12	4,0	4,7
55 55	-1A, 121Q, 168L, 181C	4-COOH-PhO-C10	26,4	138
56	-1A, 121Q, 168L, 181C	4-COOH-PhO-C10	24,7	132

60 Para comparar más elementos prolongadores, se probaron diferentes combinaciones de prolongadores y enlazadores. Todas se conjugaron a la Cys 180 o Cys 181 y se observaron funcionalidades bastante similares de los derivados de FGF21 obtenidos lo que demuestra que se puede usar una variedad de elementos prolongadores cuando se conjuga a una Cys de FGF21, tal como la Cys 180 o Cys 181.

65 Ejemplo 7: Ensayo de captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1

Los análogos modificados en el C-terminal se probaron para determinar su capacidad de aumentar la captación de glucosa en los adipocitos de ratón 3T3-L1. El siguiente ensayo se usó para determinar la actividad biológica, o la potencia, de los análogos y derivados de FGF21 de la invención.

5 Principio del ensayo

La potencia in vitro puede determinarse, además, en un ensayo con adipocitos de ratón 3T3-L1 mediante la prueba de los análogos y derivados de FGF21 para determinar su capacidad de aumentar la captación de glucosa en los adipocitos. Los adipocitos 3T3-L1 diferenciados expresan endógenamente FGFR1c y BKL. Las células 3T3-L1 no responden al FGF21 hasta después de diferenciarse, la diferenciación conduce la expresión del correceptor BKL. La activación del complejo receptor de FGFR1/BKL aumenta la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1) y por lo tanto los agonistas del FGF21 conducirán a una mayor cantidad de glucosa captada por los adipocitos de manera sensible a la dosis.

15 Descripción del ensayo

Los fibroblastos de ratón 3T3-L1 (por ejemplo, disponibles de ATCC, núm. de catálogo CL-173) se mantuvieron en medio basal (DMEM (4500 mg/L de Glucosa) con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10 % y Penicilina/Estreptomicina al 1 %). No se permite que las células alcancen la confluencia y deben pasarse (transferirse a nuevos viales) antes de alcanzar aproximadamente el 60 % de confluencia (por inspección visual).

Para el ensayo de captación de la glucosa, las células fueron 15 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (BIOCAT), y cuando alcanzaron la confluencia (alta densidad, con una visión para diferenciar las células adiposas), se realizó un cambio de medio, de medio basal a medio basal que contiene Troglitazona, IBMX, Dexametasona (comercializado por, por ejemplo, Sigma) e insulina humana (comercializado por, por ejemplo, Novo Nordisk A/S).

Las células se usaron de 7-9 días, después de iniciar la diferenciación. Las células se estimularon con concentraciones crecientes (0-300 nM) de los análogos o derivados del FGF21 de la invención durante 20 horas en medio basal. Antes de la adición de 3H-deoxi-glucosa (en lo adelante: el trazador) las células se lavaron en tampón de ensayo cálido (aproximadamente 37 C) (PBS con MgCl2 1 mM y CaCl2 2 mM), HEPES y albúmina de suero humano 0,1 %) y las células se incubaron con el trazador durante 1 hora. Esta incubación se terminó mediante el lavado, dos veces, en tampón de ensayo enfriado en hielo. Las células se lisaron con Tritón X-100 y los lisados se transfieren a una placa de 96 pocillos, se adicionó microscint-40 (comercializado por, por ejemplo, Perkin Elmer) y se contabiliza la cantidad de trazador en un contador TOP (por ejemplo, un contador superior Packard de Perkin Elmer). Se calcularon la EC50 y la Emáx del compuesto de FGF21 en cuestión. Los resultados que se muestran en las tablas 4-5 a continuación indican la EC50 (potencia) y la Emáx (eficacia) de los análogos y derivados de FGF21, respectivamente.

Tabla 4: Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de los análogos de FGF21

Compuesto	Nombre del compuesto	Captación de glucosa EC50 (nM)	Captación de glucosa Emáx (%)
1	MetFGF21	1,2	100
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	3,1	85
3	S{Beta-176}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	73	84
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	ND	ND
5	S{Beta-178}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	50	69
6	S{Beta-179}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	25	77
7	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	2,6	102
8	S{Beta-180}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21	73	72
9	S{Beta-181}-2-aminoetilsulfanil-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	5,0	74

Tabla 5. Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 de los derivados de FGF21

Compuesto	Cadena principal de proteínas	Elemento prolongador	Captación de glucosa EC50 (nM)	Captación de glucosa Emáx (%)
11	Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	Diácido C16	186	59
12	Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	Diácido C16	107	54

13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C12	2,7	87
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C14	6,7	106
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C16	9,1	98
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C18	32	109
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C20	24	53
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	Diácido C18	8	71
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C12	ND	ND
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C14	7,2	55
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C16	31	61
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C18	56	73
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C20	410	57
24	Met[Cys181]FGF21	Diácido C18	37	-

Debido a la unión de las cadenas laterales de los derivados de FGF21 a la albúmina, los derivados de FGF21 (tabla 5) tienen menores potencias que los análogos de FGF21 correspondientes (tabla 4) debido a la presencia de suero y de esta manera albúmina en el medio de ensayo basal. La disminución de la potencia se correlaciona con la longitud del elemento prolongador.

Ejemplo 8: Estudio farmacocinético en minicerdos y ratones

El propósito de este estudio fue determinar la prolongación in vivo de los derivados de FGF21 después de la administración i.v. a minicerdos y ratones, 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 análogo en cuestión. Por tiempo de vida media terminal se entiende el tiempo necesario para alcanzar la mitad de una determinada concentración plasmática en la fase de eliminación terminal.

Estudio en minicerdos

En los estudios se usaron minicerdos hembras Göttingen obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmoose, Dinamarca) de aproximadamente 7-14 meses de edad y con peso de aproximadamente 16-35 kg. Los minicerdos se alojaron individualmente (minicerdos 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 caudalis o cranial en cada animal. A los animales se les permitió una recuperación de 1 semana después de la cirugía y después se usaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de lavado adecuado entre las dosificaciones sucesivas.

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 de una cánula, y se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos hasta 11 días después de la dosificación (preferentemente a través del otro catéter o por venopunción).

Las muestras de sangre (por ejemplo 0,8 ml) se recolectaron en tubos recubiertos con EDTA (8 mM) y después se centrifugaron a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos. Las muestras de sangre se recolectaron para cubrir adecuadamente el perfil completo de concentración plasmática-tiempo del API. En las muestras de sangre de los ejemplos se recolectaron en t= predosis, 0,0833, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 horas después de la dosis.

El plasma se pipeteó en tubos Micronic en hielo seco y se mantuvo a -20 °C hasta analizarse para determinar la concentración en plasma del análogo de FGF-1 respectivo mediante el uso de ELISA. Los perfiles de concentración plasmática-tiempo individuales se analizaron mediante un método farmacocinético no compartimental en Phoenix v. 6.3 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos), u otro programa informático relevante para el análisis PK, y las vidas medias resultantes (media armónica) determinadas. La vida media terminal de los derivados de FGF21 es la media aritmética de dos determinaciones con dosificaciones diferentes, como se explicó anteriormente.

Estudio en ratones

El perfil farmacocinético de los análogos de FGF21 se probó en ratones C57bl delgados normales, n = 2-3 (aproximadamente 30 gramos). Los compuestos de FGF21 se dosificaron como una dosis intravenosa única de 20 mg/kg (aproximadamente 5 ml/kg).

5 Los niveles plasmáticos de los compuestos del FGF21 se determinaron mediante el uso del ELISA específico para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos-21 Humano (comercializado por BioVendor, núm. de catálogo RD191108200R). El software basado en PC, WinNonLin versión 6.3 de Pharsight Corporation, Cary N.C., se usó para el cálculo farmacocinético. Los resultados se proporcionan en la tabla 6.

10 Tabla 6: Perfiles farmacocinéticos de los análogos de FGF21.

Compuesto	Cadena principal de proteínas	Elemento prolongador	Vida media en ratones (horas)	Vida media en minicerdos (horas)
1	MetFGF21	-	1	2
13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C12	1	ND
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C14	1	3
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C16	3	23
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C18	12	70
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	Diácido C20	ND	ND
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21	Diácido C18	ND	ND
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C12	1	
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C14	3	2
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C16	4	25
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C18	14	85
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	Diácido C20	19	ND
24	Met[Cys181]FGF21	Diácido C18	12	ND

35 Como puede observarse en la tabla 6, la vida media en plasma aumenta con la longitud de la cadena de ácido graso del elemento prolongador en los minicerdos y ratones.

Ejemplo 9: Reducción del peso corporal en ratones delgados

40 Para determinar la potencia in vivo de los derivados de FGF21, se estudió el efecto sobre el peso corporal en ratones C57BL delgados después de la administración subcutánea (s.c.). Se ha demostrado anteriormente que la pérdida de peso inducida por FGF21 en ratones delgados predice el efecto en ratones obesos y, por lo tanto, los ratones delgados se consideran un modelo de selección bueno.

45 Los compuestos se administraron por vía s.c. 1 mg/kg, ya sea una vez (QD) o dos veces (BID) diariamente en fosfato 10 mM, glicerol al 2 % (p/vol), polisorbato 80 500 ppm (=0,05 %), pH=8,15, (2 ml/kg) durante 7 días (n=7-8). Los grupos respectivos tratados con vehículo (control) se trataron con fosfato 10 mM, glicerol al 2 % (p/vol), polisorbato 80 500 ppm (=0,05 %), pH=8,15, (2 ml/kg) s.c. dos veces al día durante 7 días (n=6-8). El peso corporal se midió antes de la dosificación y nuevamente después de 7 días de tratamiento. Los resultados pueden observarse en la Tabla 7.

50 Tabla 7: Cambio en el peso corporal desde el valor inicial (porcentaje) del día 1 a 7

Compuesto	Dosificación	n/grupo	Media	SD
			Δ peso corporal (%)	Δ peso corporal (%)
Vehículo	BID	8	2,84	2,65
1	BID	8	-1,88**	2,52
2	BID	8	-1,98**	3,33
14	QD	8	1,85	3,33
15	QD	8	-4,48***	2,41
16	QD	8	-10,59***	3,39
21	QD	8	0,18	2,12
Vehículo	BID	6	0,44	3,27
13	BID	8	-2,04	1,30
14	BID	8	-3,09*	1,61
19	BID	7	0,04	1,11
20	BID	8	-0,94	2,94

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 prueba de Dunnet post hoc ANOVA de una vía que compara el compuesto vs. el vehículo respectivo, n=6-8

5 La potencia in vivo medida como la pérdida del peso corporal de los derivados de FGF21 que tienen la cadena lateral en la posición 180 es mayor que los derivados que tienen la misma cadena lateral en la posición 181. La potencia in vivo se correlaciona por lo tanto con la potencia in vitro. El efecto sobre la reducción del peso corporal depende de la vida media en plasma. Si la vida media en plasma es corta, la dosificación dos veces al día aumenta la eficacia.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

15 <120> Derivados de FGF21 y sus usos

<130> 140109WO01

<160> 20

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 181

25 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

30 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

35 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

40 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

45 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

50 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

55 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

ES 2 742 503 T3

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140

5
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160

10 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175

15 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 2
 <211> 182
 <212> PRT
 20 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro

25 <400> 2

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

30 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

35 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

40 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

45 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

50 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

55 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

ES 2 742 503 T3

5 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

20 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 3
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro

<400> 3

30 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

35 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

55 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

55 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

ES 2 742 503 T3

5 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

20 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 4
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro

<400> 4

30 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

35 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

55 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

ES 2 742 503 T3

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 5 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 Cys Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 20
 <210> 5
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 25
 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 <400> 5
 30 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 35 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 55 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

ES 2 742 503 T3

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

5 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

Ser Cys Ser Tyr Ala Ser
 180

20
 <210> 6
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25
 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro

30
 <400> 6

30 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

35 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

55 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

55 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

ES 2 742 503 T3

5 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 20 Ser Pro Cys Tyr Ala Ser
 180
 <210> 7
 <211> 182
 25 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 30 <400> 7
 35 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 50 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 55 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

ES 2 742 503 T3

5 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 10 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 15 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 20 Ser Pro Ser Cys Ala Ser
 180
 <210> 8
 <211> 182
 25 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 30 <400> 8
 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 35 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 40 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 45 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 55 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

ES 2 742 503 T3

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

5 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

10 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

15 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

20 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Cys Ser
 180

25 <210> 9
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 <400> 9

35 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

40 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

45 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

50 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

55 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

ES 2 742 503 T3

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110

5 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125

10 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140

15 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160

20 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175

25 Ser Pro Ser Tyr Cys
 180

30 <210> 10
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15

40 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

45 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45

50 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60

55 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

60 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

ES 2 742 503 T3

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 5
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 10
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 15
 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 20
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Cys
 180
 25
 <210> 11
 <211> 182
 <212> PRT
 30 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
 35 <400> 11
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 40
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 50
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 55
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95

ES 2 742 503 T3

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 5

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 10

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 15

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 20

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 25

Ser Pro Ser Tyr Ala Cys
 180
 30

<210> 12
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
 35

<400> 12
 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 40

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 45

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 50

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 55

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80

ES 2 742 503 T3

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

5 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

10 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

15 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

20 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

25 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Cys Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

30 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 13
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
<400> 13

40 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

45 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

50 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

55 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

60 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

ES 2 742 503 T3

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 5
 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 10
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 15
 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 20
 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 25
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Cys Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 30
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 35
 <210> 14
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
 45
 <400> 14
 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 50
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 55
 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 55

ES 2 742 503 T3

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

5 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

10 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

15 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

20 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

25 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Cys Gly Pro Ser Gln Gly Arg
165 170 175

30 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

35 <210> 15
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
<400> 15

45 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

50 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

55 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

60 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

ES 2 742 503 T3

5 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 10 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 15 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 20 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 25 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Cys Pro Ser Gln Gly Arg
 165 170 175
 30 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 35 <210> 16
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 <400> 16
 45 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 50 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 55

ES 2 742 503 T3

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

5 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

10 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

15 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

20 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

25 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

30 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg
165 170 175

35 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

40 <210> 17
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro

45 <400> 17

Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

50 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

55 His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

ES 2 742 503 T3

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 5

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 10

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 15

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 20

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 25

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 30

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 35

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Cys Gln Gly Arg
 165 170 175
 40

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 <210> 18
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Proteína artificial basada en FGF21 humano maduro
 45

<400> 18
 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 50

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30
 55

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

ES 2 742 503 T3

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 5
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 10 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 15 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 20 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 25 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 30 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 35 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Cys Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 40 <210> 20
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Proteina artificial basada en FGF21 humano maduro
 <400> 20
 50 Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 55 Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
 20 25 30

ES 2 742 503 T3

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
 35 40 45
 5
 Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 50 55 60
 10 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
 65 70 75 80
 15 Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
 85 90 95
 20 Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
 115 120 125
 25 Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
 130 135 140
 30 Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
 145 150 155 160
 35 Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Cys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 40

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de una proteína FGF21,

5 en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1)

en donde dicho derivado comprende un prolongador unido a dicho residuo de Cys por medio de un enlazador;

10 en donde el prolongador se selecciona del grupo de



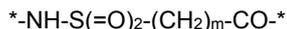
15 y



20 en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18; y

en donde el enlazador comprende al menos uno del Químico 2, Químico 3 y Químico 4:

en donde el Químico 2 se selecciona de:



y



en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5,

35 en donde el Químico 3 es $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}^*$, 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, y

en donde el Químico 4 se selecciona de:



y



45 en donde m es un número entero en el intervalo de 1-5; y

en donde el Químico 2, Químico 3, y Químico 4 están interconectados por medio de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo $*-\text{NH}$ al extremo CO^* del prolongador, y en su extremo CH_2^* al átomo de azufre del residuo de Cys en una posición correspondiente a la posición 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o la posición 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

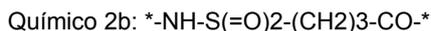
2. El derivado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el Químico 1 se selecciona del grupo de:



y



3. El derivado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el Químico 2 se selecciona del grupo de:



y

Químico 2c: *-NH-CH₂-ciclohexano-CO-*

4. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el Químico 4 se selecciona de:

5

Químico 4a: *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*

y

10

Químico 4b: *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*

5. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en la posición correspondiente a la posición 167, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 180 o 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1), tal como 180 de FGF21 humano maduro.

15

6. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína comprende un residuo de Cys en la posición correspondiente a la posición 180 o 181 de FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

20

7. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende cambios de aminoácidos en una o más posiciones, correspondientes a una o más de las posiciones 121 o 168 del FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

25

8. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende una adición de un residuo de Ala en una posición correspondiente al N-terminal del FGF21 humano maduro (SEQ ID NO:1).

30

9. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende uno o más de 121Q y 168L, tal como 121Q o 168L o ambas.

35

10. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

40

11. El derivado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 o 10.

45

12. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el prolongador comprende el Químico 1a: HOOC-(CH₂)₁₆-CO-*

50

13. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazador comprende uno, dos o tres del:

Químico 2a: *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*,

55

Químico 3a: *-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-*

y

Químico 4a: *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*

60

14. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazador consiste en un elemento del Químico 2, dos elementos del Químico 3, y un elemento del Químico 4.

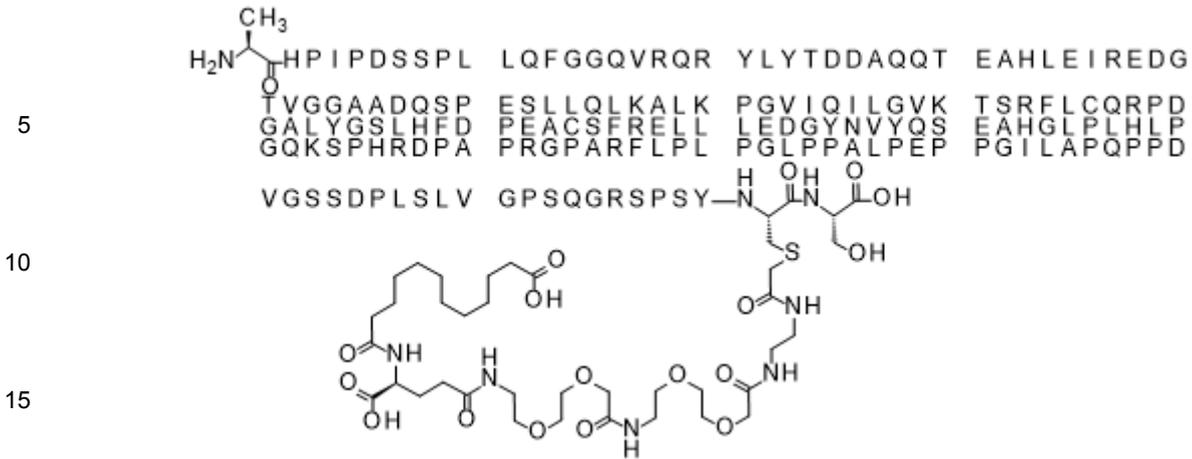
65

15. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el derivado es uno de los siguientes:

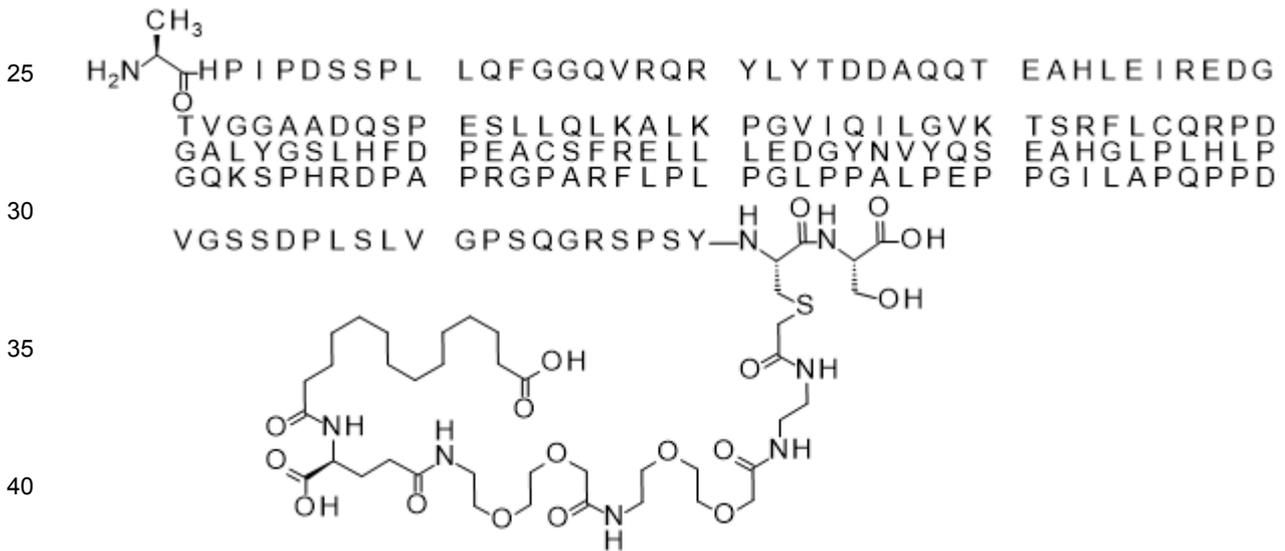
S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 13)

60

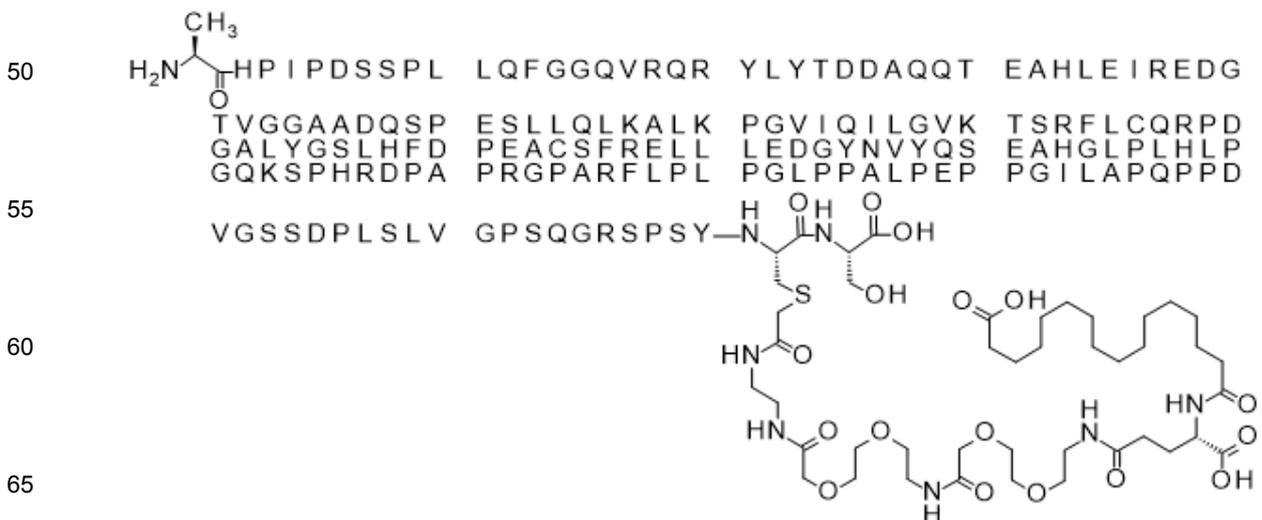
65



20 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxy-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 14);

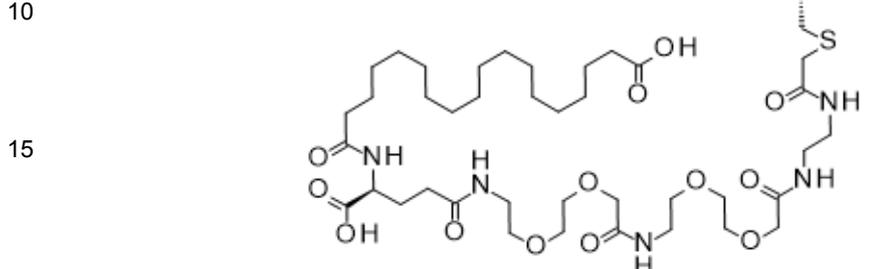


45 S{Beta-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxy-4-(15-carboxypentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 15)



5 H₂N-CH(CH₃)-C(=O)-HP I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD

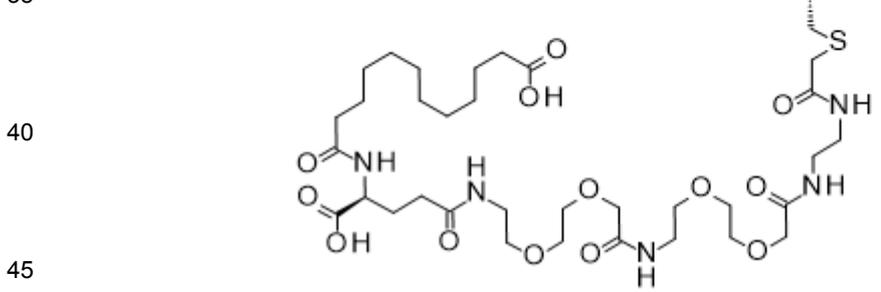
10 VGSSDPLSLV GPSQGRSPSY-NH-CH(CH₃)-C(=O)OH



25 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 19)

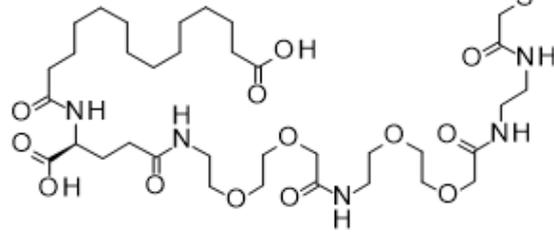
30 H₂N-CH(CH₃)-C(=O)-HP I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G
 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD

35 VGSSDPLSLV GPSQGRSPSY-AN-CH(CH₃)-C(=O)OH

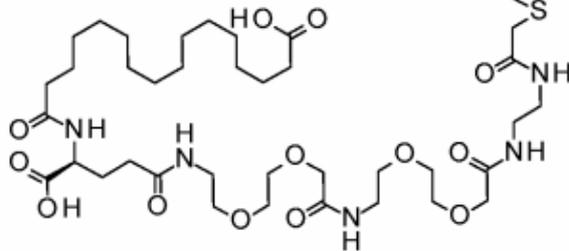


50 S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 20)

55
60
65

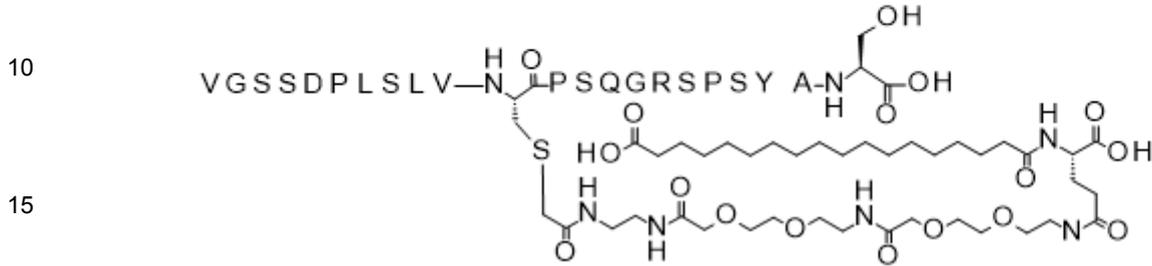
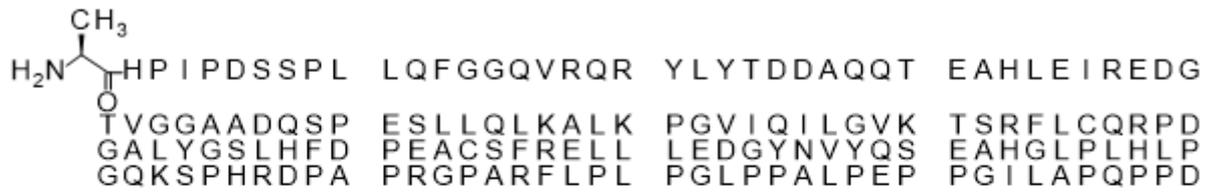


S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 21);

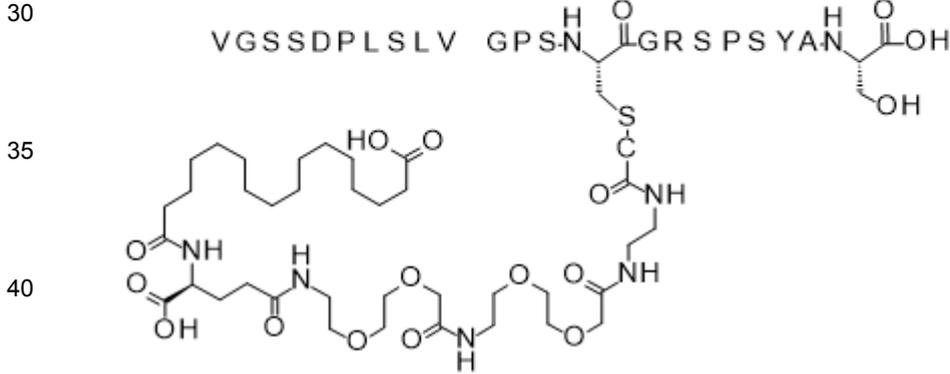


S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 22)

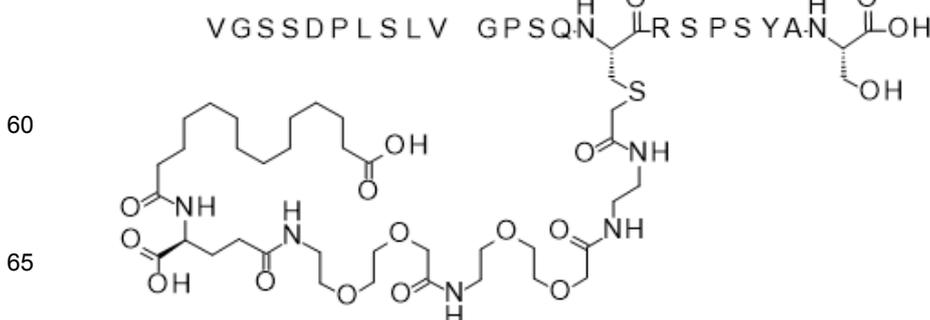
50
55
60
65



20
 S(Beta-173)-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys173]FGF21 (Compuesto 37)

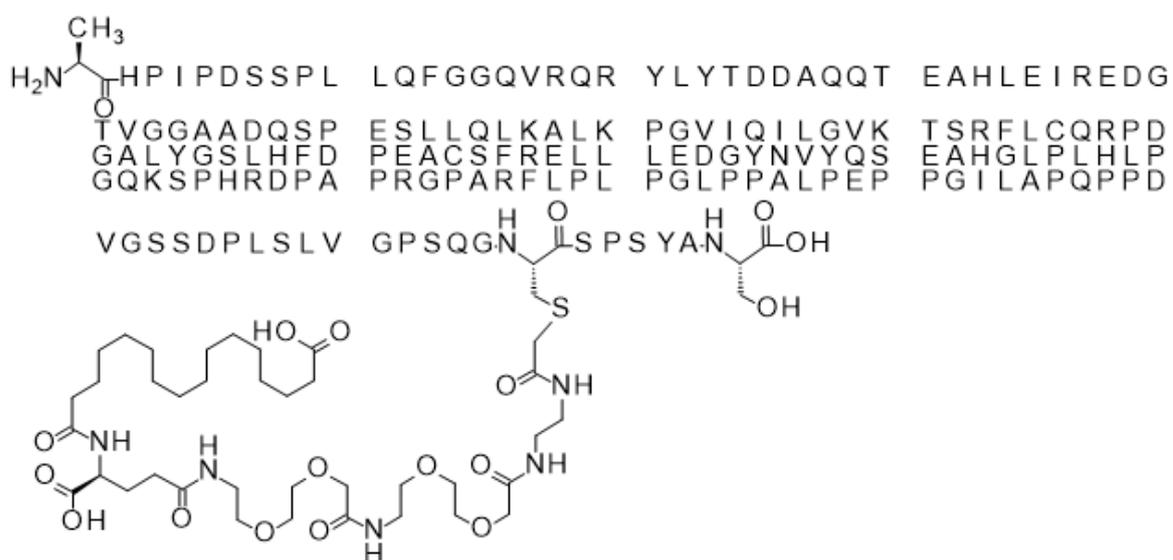


45
 S(Beta-174)-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21 (Compuesto 38)

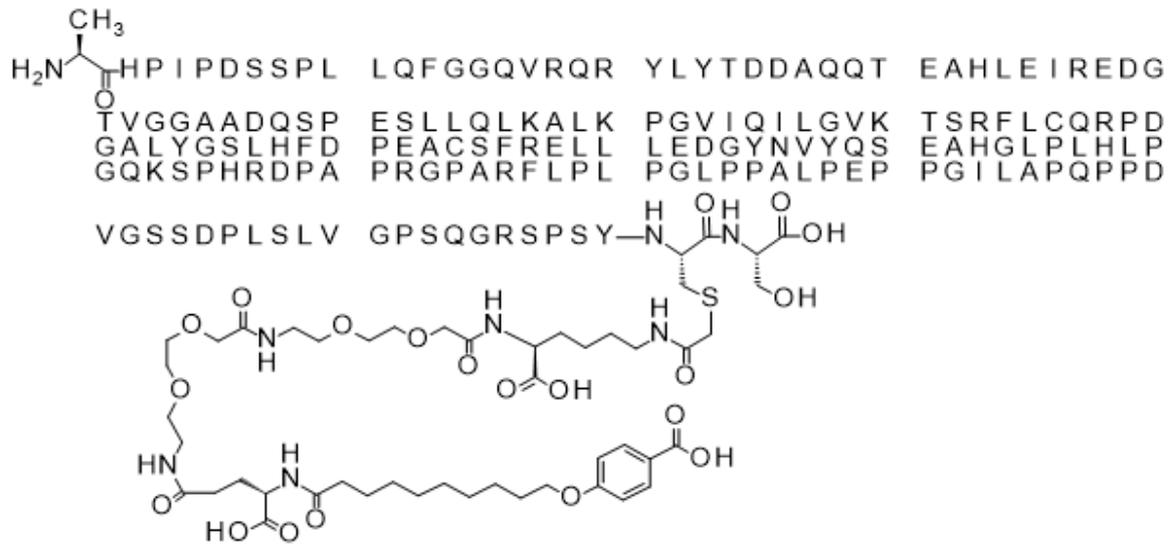


S{Beta-175}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys175]FGF21 (Compuesto 41)

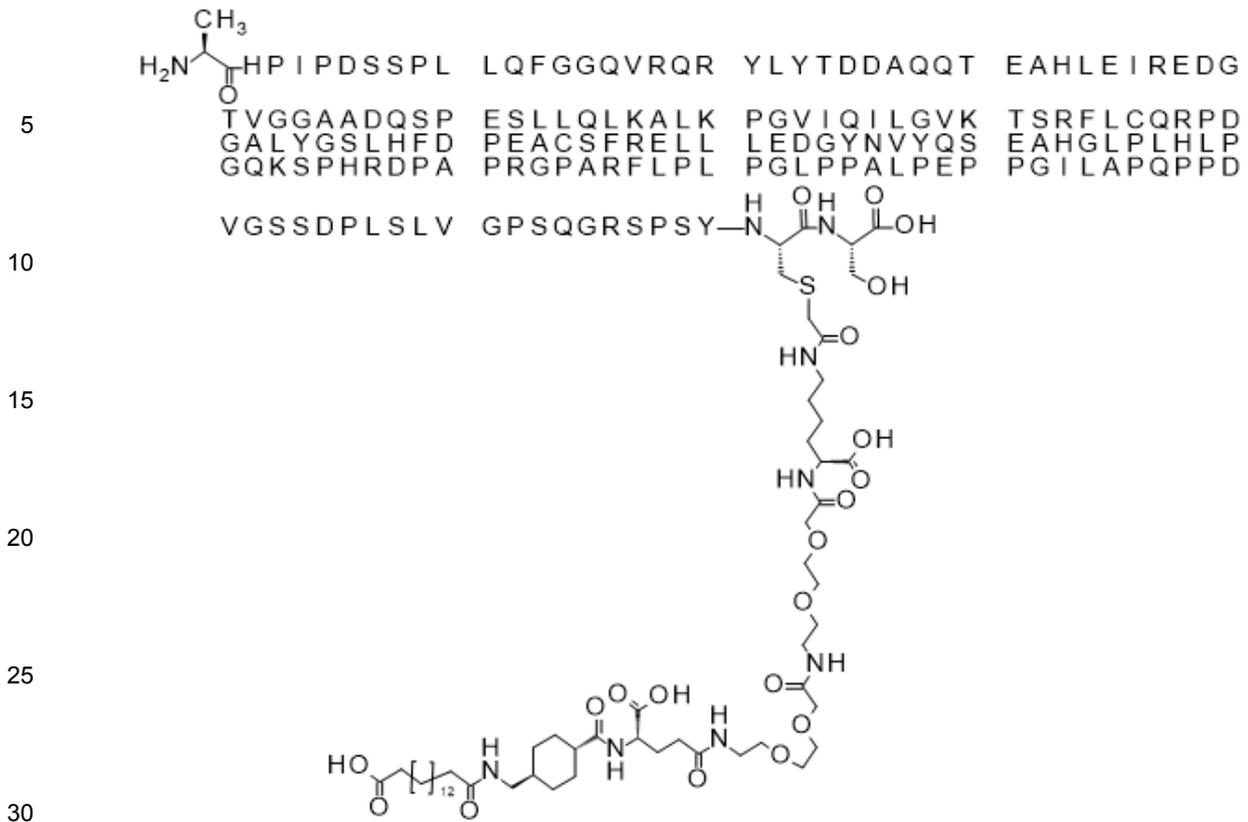
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



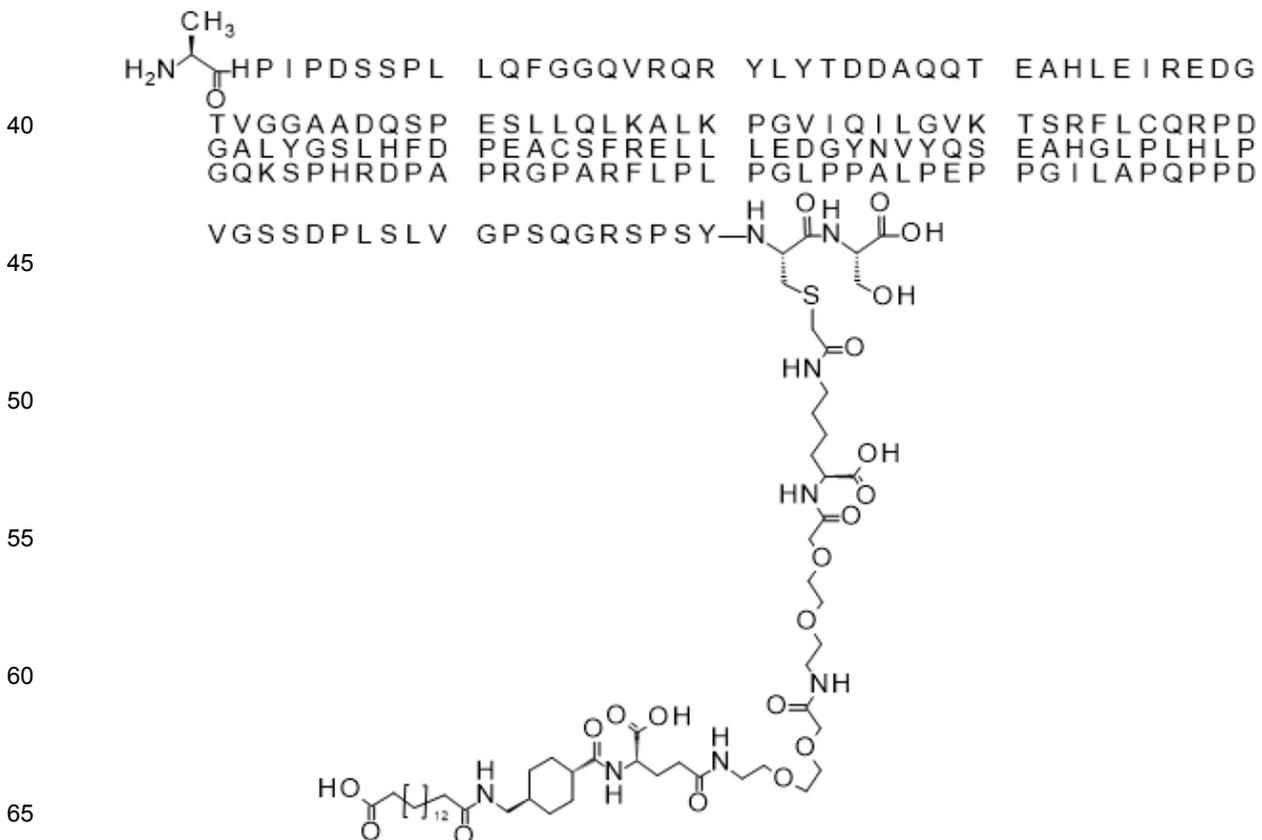
4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 43)



4-[10-[[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 44)



Ácido 18-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-acetamido)-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-18-oxo-octadecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 53)



Ácido 12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-acetamidoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]carbamoil]ciclohexil]metilamino]-12-oxo-dodecanoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 54)

5

CC(N)C(=O)NHPIDSSPL LQFGGQVRQR YLYTDDAQQT EAHLEIREDG
 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 10 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD

15

VGSSDPLSLV GPSQGRSPSY-NH-CH(OH)-CH(OH)-COOH

20

25

30

35

40

4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 55)

45

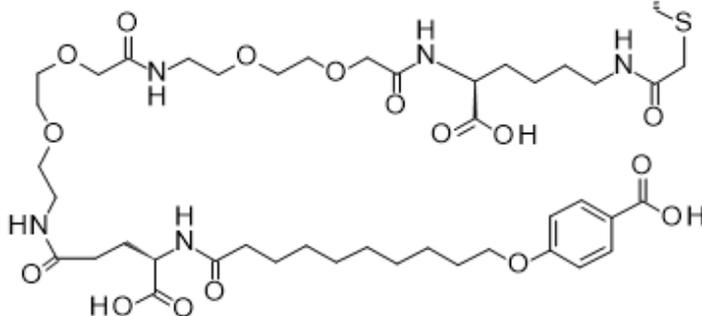
CC(N)C(=O)NHPIDSSPL LQFGGQVRQR YLYTDDAQQT EAHLEIREDG
 TVGGAADQSP ESLLQLKALK PGVIQILGVK TSRFLCQRPD
 50 GALYGSLHFD PEACSFRELL LEDGYNVYQS EAHGLPLHLP
 GQKSPHRDPA PRGPARFLPL PGLPPALPEP PGILAPQPPD

55

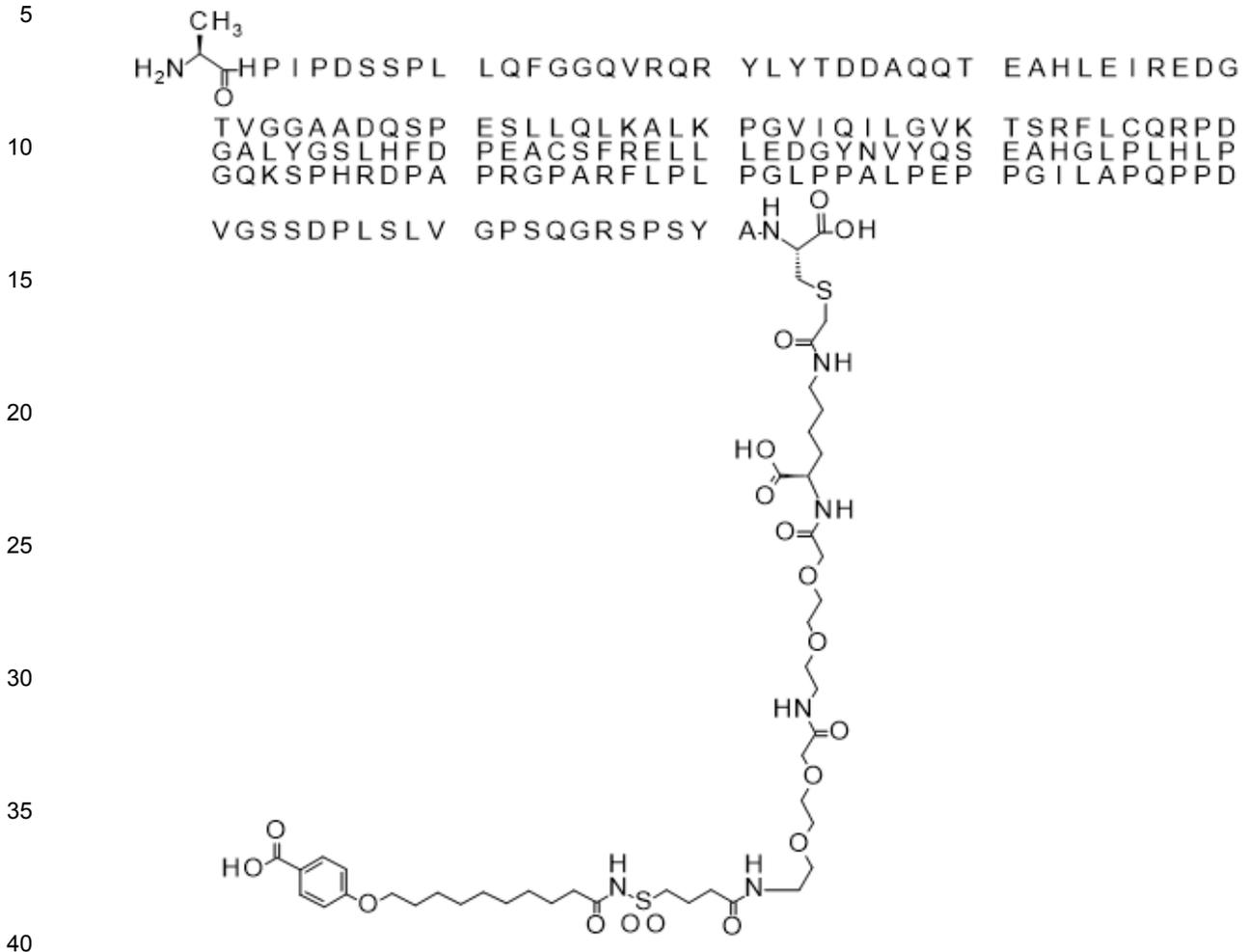
VGSSDPLSLV GPSQGRSPSY AN-CH(OH)-COOH

60

65

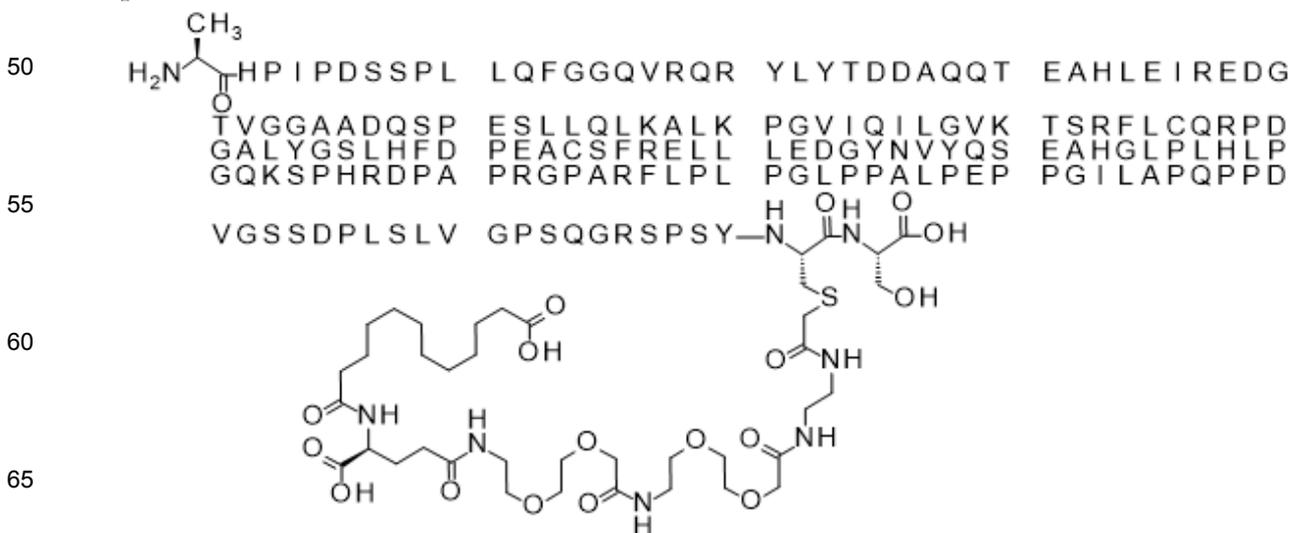


4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-acetamido-1-carboxi-pentil]amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]sulfonilamino]-10-oxo-decoxi]ácido benzoico-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 56)



16. Un derivado de una proteína FGF21, en donde dicho derivado es uno de los siguientes:

45 S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 13)



S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 14);

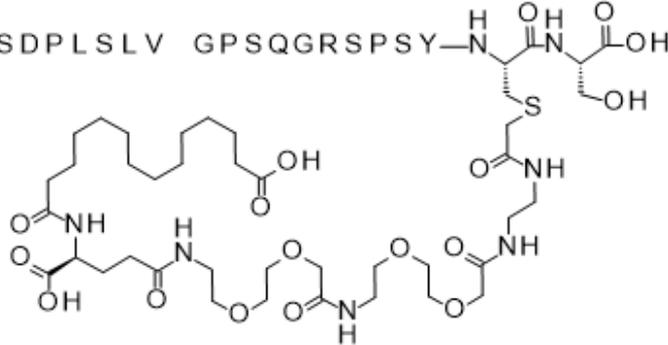
5



10

15

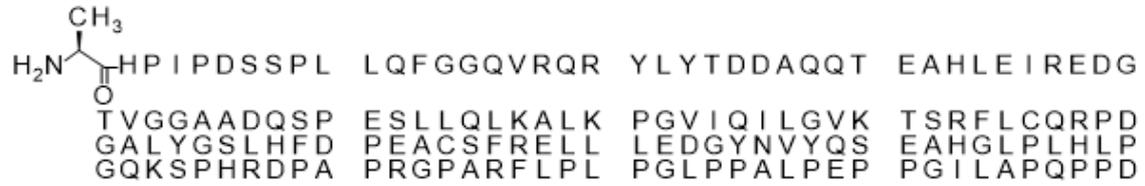
20



25

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 15)

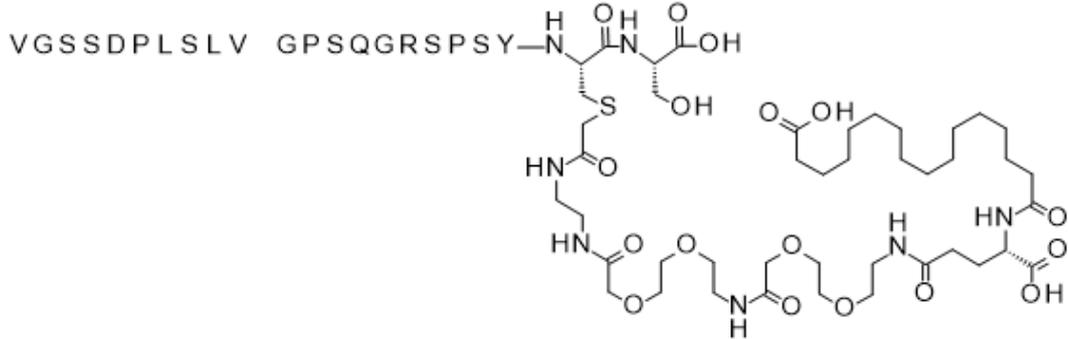
30



35

40

45



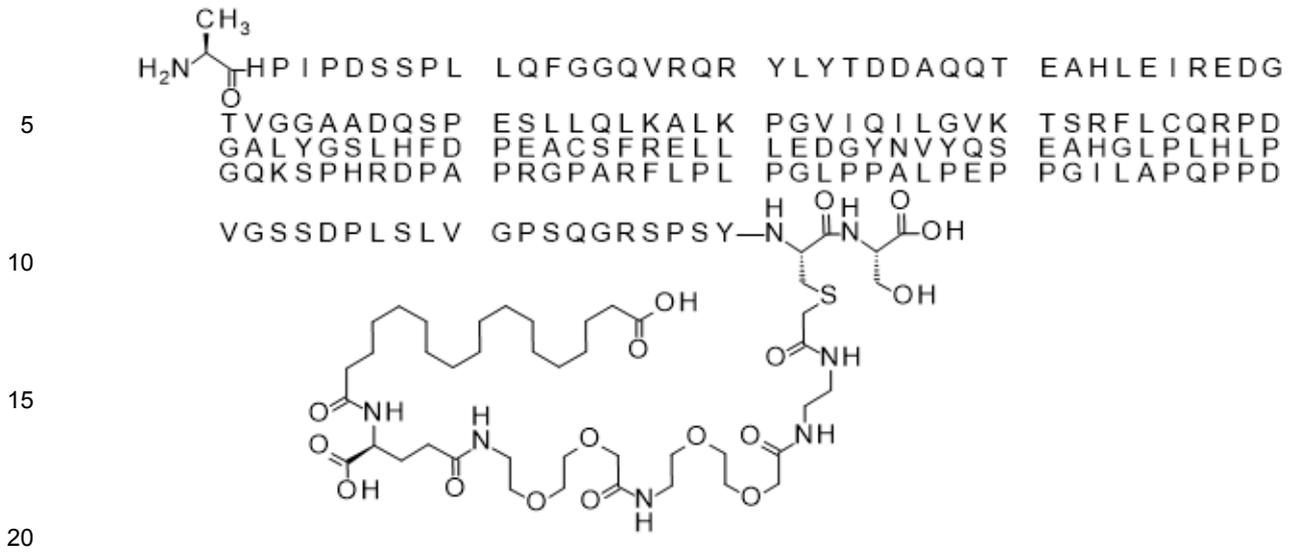
50

S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 16)

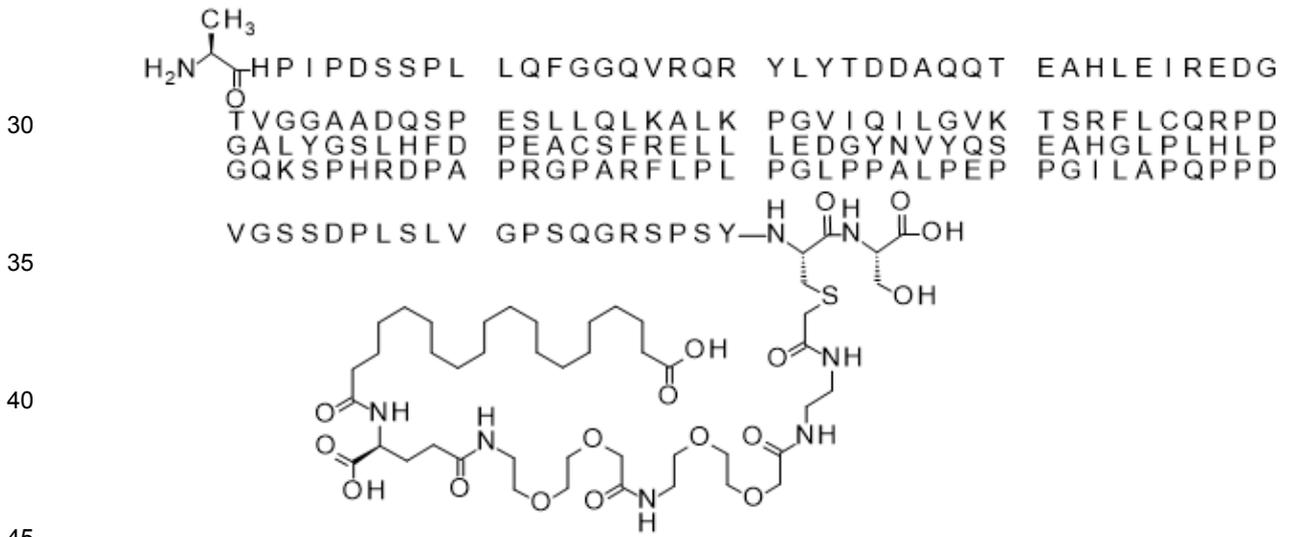
55

60

65

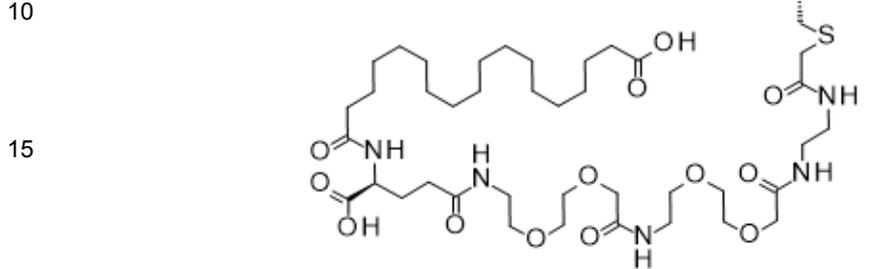


S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxionadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (Compuesto 17)



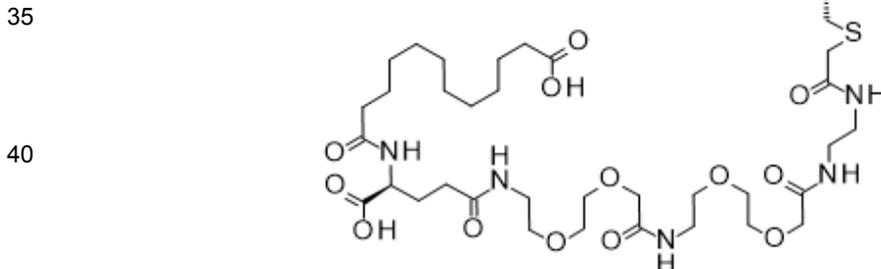
S{Beta-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (Compuesto 18)

50
55
60
65



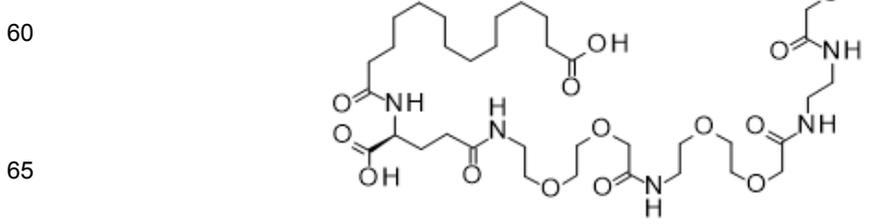
20

S(Beta-181)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-(11-carboxiundecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 19)



40

S(Beta-181)-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-(13-carboxitridecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 20)

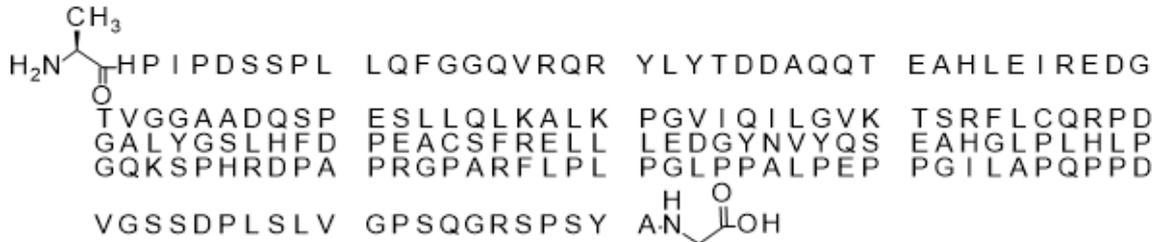


60

65

S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 21);

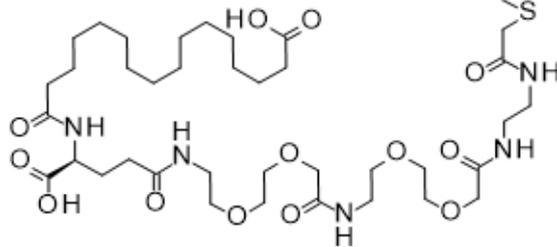
5



10

15

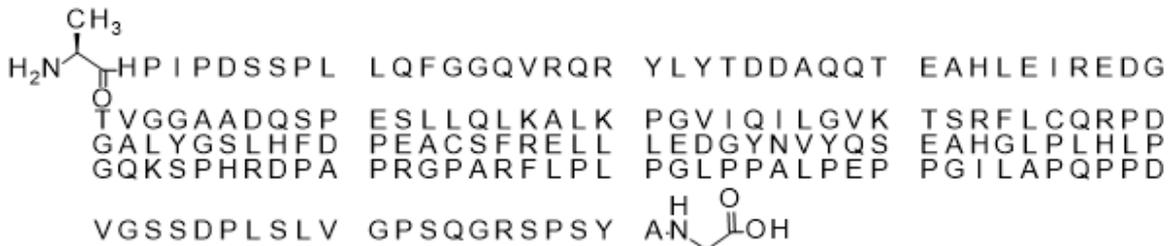
20



25

S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 22)

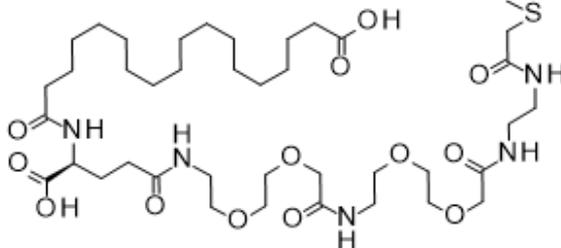
30



35

40

45



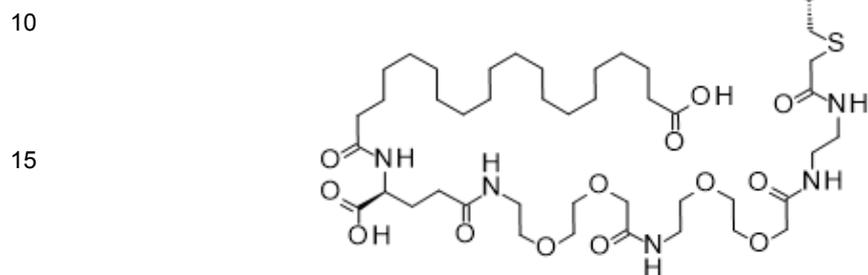
50

S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (Compuesto 23)

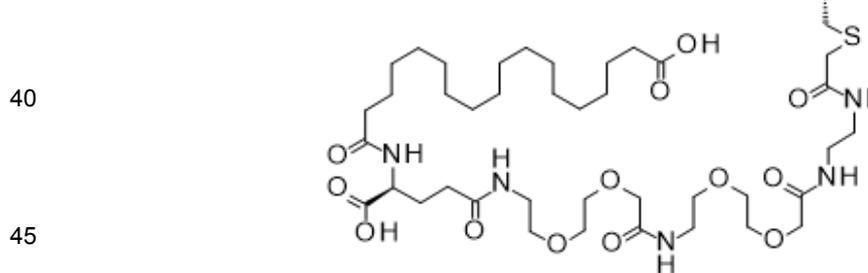
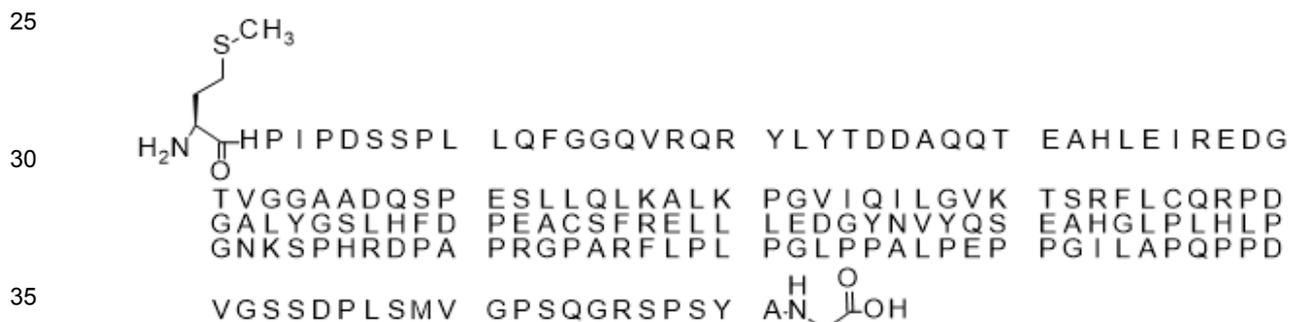
55

60

65



S{Beta-181}-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[4S)-4-carboxy-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etilamino]-2-oxoetil]-Met[Cys181]FGF21 (Compuesto 24)



17. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para usar como un medicamento.
- 50 18. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para usar en un método de tratamiento y/o prevención de cualquiera de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como obesidad, trastornos alimentarios, enfermedades cardiovasculares complicaciones diabéticas, y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células β; y/o para retardar o prevenir la progresión de una enfermedad diabética; y/o para el tratamiento y/o la prevención de esteatosis hepática y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 55