

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 705**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041678**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12759773 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2758426**

54 Título: **Nuevos análogos de glucagón**

30 Prioridad:

23.09.2011 EP 11182476

26.09.2011 US 201161539148 P

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

18.06.2020

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

LAU, JESPER F.;

KRUSE, THOMAS;

THØGERSEN, HENNING;

SENSFUSS, ULRICH y

NIELSEN, PETER KRESTEN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 767 705 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

Nuevos análogos de glucagón

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a nuevos análogos de péptidos de glucagón, al uso de dichos péptidos en la terapia, a los métodos de tratamiento que comprenden la administración de dichos péptidos a pacientes, y al uso de dichos péptidos en la fabricación de medicamentos.

10

Antecedentes de la invención

15 El control preciso de los niveles de glucosa en sangre es de vital importancia para los humanos, así como también para otros mamíferos. Está bien establecido que las dos hormonas insulina y glucagón son importantes para mantener los niveles correctos de glucosa en sangre. Mientras que la insulina actúa en el hígado y los tejidos periféricos al reducir los niveles de glucosa en sangre a través de una mayor captación periférica de glucosa y una menor producción de glucosa del hígado, el glucagón actúa principalmente en el páncreas y el hígado, al aumentar los niveles de glucosa en sangre a través de la regulación por aumento de la gluconeogénesis y la glucogenólisis. También se ha informado que el glucagón aumenta la lipólisis, induce cetosis y reduce los niveles de triglicéridos plasmáticos en plasma [Schade y Eaton, *Acta Diabetologica*, 1977, 14, 62].

20

25 El glucagón es una parte importante del mecanismo de defensa contra la hipoglucemia y la administración de una dosis baja de glucagón puede prevenir la hipoglucemia inducida por insulina o mejorar la capacidad de recuperación de la hipoglucemia. También se ha demostrado que el agonismo del glucagón ejerce efectos sobre el metabolismo de los lípidos, el gasto energético y la ingesta de alimentos [Habegger y otros *Nature Reviews Endocrinology* 2010, 6, 689-697].

30

Una gran cantidad de personas que padecen diabetes, en particular diabetes tipo 2, tienen sobrepeso o son obesas. La obesidad representa un factor de alto riesgo en enfermedades comunes graves e incluso mortales y para la mayoría de los diabéticos es altamente conveniente que su tratamiento no cause ganancia de peso.

35

Se conocen en la técnica varias solicitudes de patente que describen diferentes análogos basados en glucagón y coagonistas de los receptores de GLP-1/glucagón, tales como, por ejemplo, las patentes WO2008/086086, WO2008/101017, WO2007/056362, WO2008/152403 y WO96/29342. Otros análogos de glucagón descritos son PEGilados (por ejemplo, WO2007/056362) o acilados en posiciones específicas del glucagón humano nativo (por ejemplo, WO96/29342). Se han descrito péptidos de glucagón para la prevención de la hipoglucemia, como por ejemplo en la solicitud de patente US7314859.

40

El glucagón tiene un uso potencial limitado en los productos farmacéuticos debido al aclaramiento rápido de la circulación con una vida media de aproximadamente 5 minutos. Un alto aclaramiento de un agente terapéutico es inconveniente en los casos en que se desea mantener un alto nivel sanguíneo del mismo durante un período prolongado de tiempo, ya que entonces serán necesarias administraciones repetidas. En algunos casos, es posible influir en el perfil de liberación de péptidos mediante la aplicación de composiciones farmacéuticas adecuadas, pero este enfoque tiene varias deficiencias y no es generalmente aplicable.

45

Actualmente, el glucagón está disponible como una formulación liofilizada, con una acción de corta duración, restringida a menos de una hora a pesar de un nivel de glucagón que alcanza niveles muy superiores a los niveles de glucagón endógeno. Por lo tanto, existe la necesidad de compuestos de glucagón modificados químicamente para suministrarse a niveles continuos, de manera que se logre una vida media biológica más larga, es decir, péptidos de glucagón modificados con un perfil de acción prolongado.

50

La estabilidad física y química del glucagón es pobre cuando se disuelve en una solución acuosa. Las soluciones de glucagón forman geles y fibrillas en cuestión de horas o días, en dependencia de la pureza del péptido, la concentración de sales, el pH y la temperatura (Beaven y otros *European J. Biochem.* 1969, 11, 37-42). El glucagón contiene varios aminoácidos lábiles o secuencias de aminoácidos que pueden dar lugar a la desamidación, escisión, formación de aspartimida e isomerización. Además, la solubilidad del glucagón humano es muy pobre en el rango de pH de 3,5-9,5.

55

Breve descripción de la invención

60

La presente invención se refiere al uso de dichos péptidos en terapia, a métodos de tratamiento que comprenden la administración de dichos péptidos a pacientes, y al uso de dichos péptidos en la fabricación de medicamentos para su uso en el tratamiento de la diabetes, obesidad y enfermedades y afecciones relacionadas.

65

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una o más sustituciones en las posiciones de los aminoácidos 3, 15 y/o 16 del péptido de glucagón y la unión en la posición 24 de dicho péptido de glucagón de un

sustituyente que comprende tres o más restos cargados negativos, en donde uno de dichos restos cargados negativamente es distal de un resto lipofílico, conducen a agonistas de glucagón con estabilidad mejorada.

5 La presente invención proporciona nuevos péptidos de glucagón modificados con solubilidad mejorada a pH neutro, estabilidad física mejorada hacia la formación de gel y fibrillas, estabilidad química mejorada y vida media aumentada, mientras que también tiene propiedades farmacocinéticas mejoradas.

En una primera modalidad (Modalidad 1), la presente invención se refiere a un péptido de glucagón que comprende:

10 • SEQ ID 1, en donde X₂₄ representa Lys, en donde al menos una de las siguientes sustituciones está presente: X₁₅ es Glu o X₁₆ es Ala, Ile, Phe, Arg, Thr, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr y hasta seis sustituciones de aminoácidos adicionales en dicho péptido de glucagón y

15 • un sustituyente que comprende un resto lipofílico y tres o más restos cargados negativamente, en donde uno de dichos restos cargados negativamente es distal de dicho resto lipofílico y donde el sustituyente se une al nitrógeno de la cadena lateral de Lys en la posición 24,

o una sal, amida o ácido farmacéuticamente aceptable de este.

20 En otra modalidad, la presente invención también proporciona formas éster del péptido de glucagón.

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de la presente invención en la terapia, a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención y al uso de los compuestos de la invención en la fabricación de medicamentos.

25 Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra el efecto de los análogos de glucagón sobre el peso corporal en ratas DIO. A las ratas DIO se les administró una dosis subcutánea diaria (4 nmol/kg) de un análogo de glucagón durante tres semanas y se midió el peso corporal diariamente. Los cuatro análogos del glucagón redujeron el peso corporal con el tiempo.

Descripción de la invención

35 Los péptidos de la presente invención proporcionan nuevos péptidos de glucagón modificados con un perfil de acción prolongado además de proporcionar dichos péptidos de glucagón modificados en composiciones farmacéuticas estables a pH fisiológico. La presente invención se refiere a nuevos análogos de glucagón con solubilidad mejorada, estabilidad física mejorada hacia la formación de gel y fibrillas, estabilidad química mejorada y con una vida media aumentada.

40 Los inventores descubrieron sorprendentemente que los compuestos de la presente invención tienen una estabilidad física mejorada hacia la formación de gel y fibrillas, una estabilidad química mejorada y una vida media aumentada, mientras que también tienen una solubilidad acuosa mejorada a pH neutro o pH ligeramente básico.

45 En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido de glucagón, en donde X₁₆ es Ile, Phe, Arg, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr.

En otra modalidad, X₁₆ es Ile, Val, Leu o Phe.

50 Entre las modalidades adicionales de la presente invención están las siguientes:

Modalidad 1: Un péptido de glucagón que comprende:

55 • la SEQ ID 1, en donde X₂₄ es Lys y en donde al menos una de las siguientes sustituciones está presentes: X₁₅ es Glu o X₁₆ es Ala, Ile, Phe, Arg, Thr, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr, y hasta seis sustituciones de aminoácidos adicionales están presentes en dicho péptido de glucagón y

60 • un sustituyente que comprende tres o más restos cargados negativamente, en donde uno de dichos restos cargados negativamente es distal de un resto lipofílico y donde el sustituyente se une al nitrógeno de la cadena lateral de Lys en la posición 24,

o una sal, éster, amida o ácido farmacéuticamente aceptable de este.

65 Modalidad 2: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde X₁₆ es Ile, Phe, Arg, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr.

Modalidad 3: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde X₁₆ es Ile, Val, Leu o Phe.

Modalidad 4: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde dichas sustituciones de aminoácidos adicionales se pueden seleccionar de las siguientes posiciones de dicho péptido de glucagón:

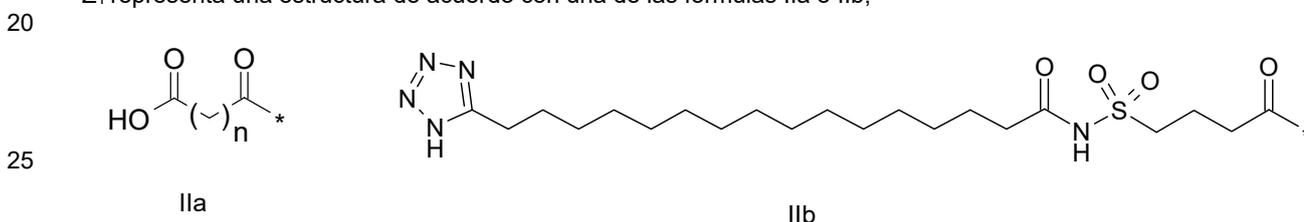
- 5 X₁₀ es Val,
- X₁₂ es Arg,
- X₁₇ es Lys,
- X₂₀ es Lys,
- X₂₁ es Glu,
- X₂₇ es Leu,
- 10 X₂₈ es Ser, Ile, Gly o Thr, y
- X₂₉ es Val, Leu o Ile.

Modalidad 5: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde dicho sustituyente tiene la fórmula II:

15 Z₁-Z₂-Z₃-Z₄ [II]

en donde,

Z₁ representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIa o IIb;

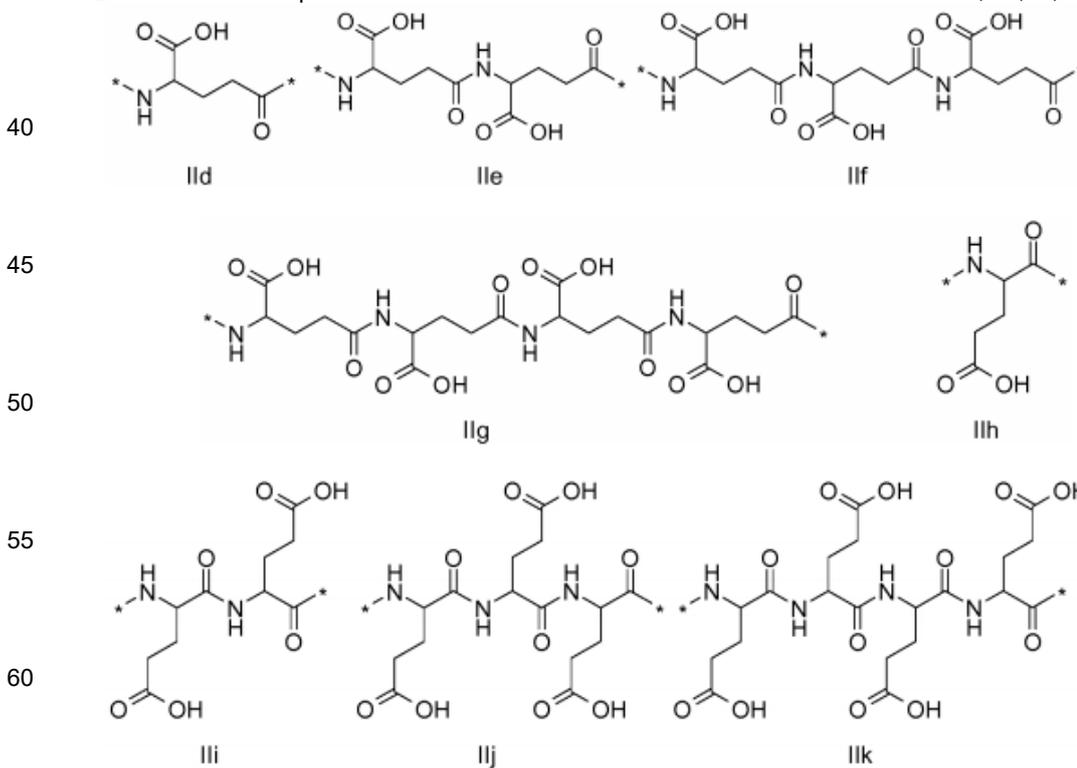


en donde n en la Fórmula IIa es 6-20,

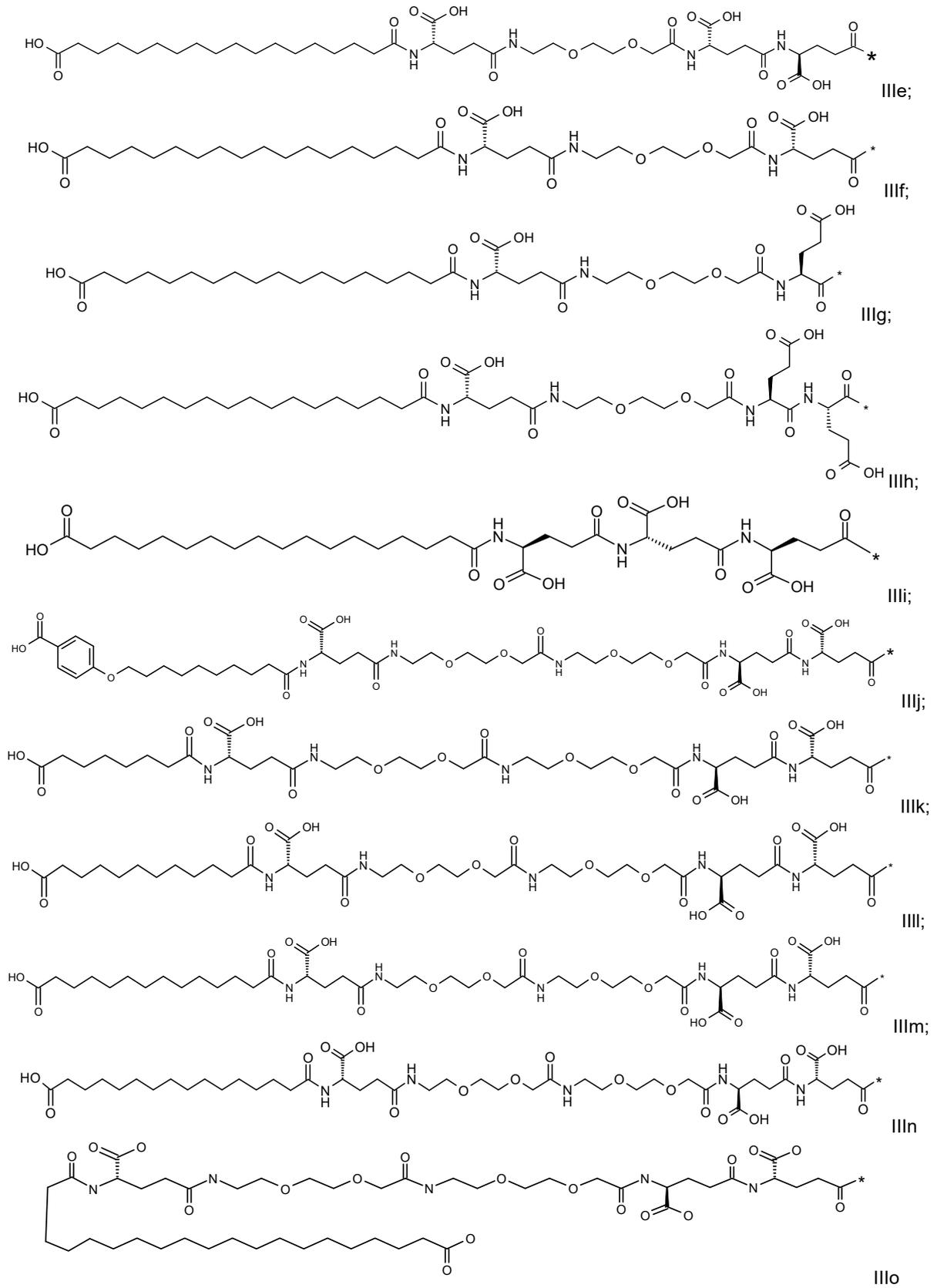
el símbolo * en las fórmulas IIa y IIb representa el punto de unión al nitrógeno en Z₂;

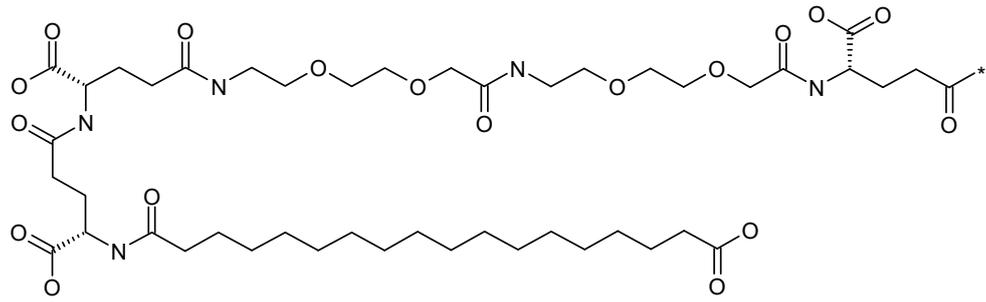
si Z₂ está ausente, Z₁ se une al nitrógeno en Z₃ en el símbolo * y si Z₂ y Z₃ están ausentes Z₁ se une al nitrógeno en Z₄ en el símbolo *

35 Z₂ está ausente o representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIc, IId, IIe, IIc, IIg, IIh, Iii, IIj o IIk;

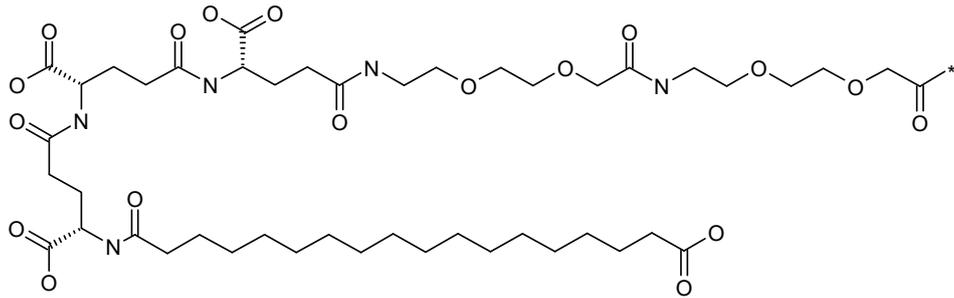


65 en donde cada resto de aminoácido tiene independientemente la estereoquímica L o D;

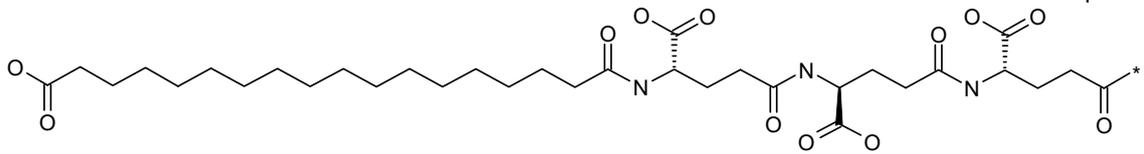




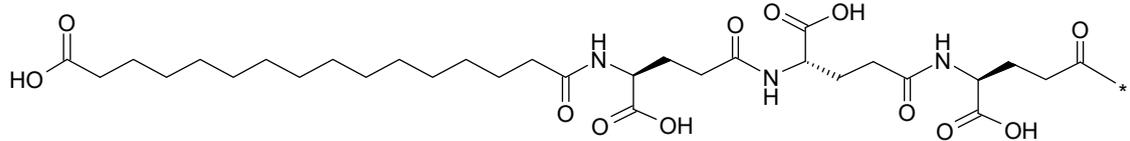
IIIp



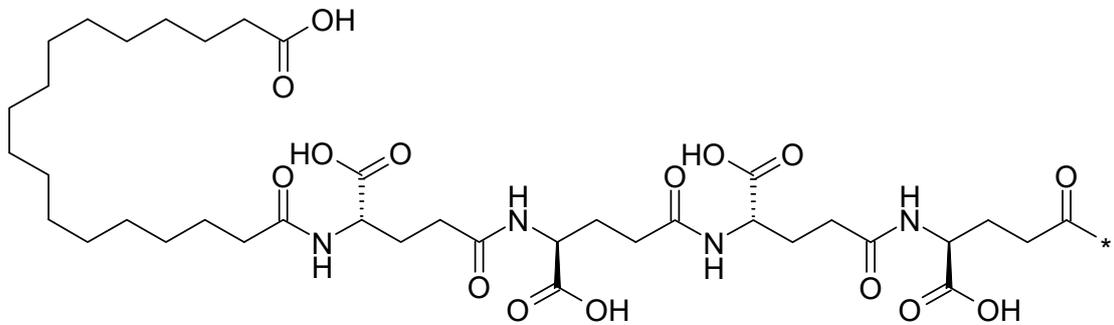
IIIq



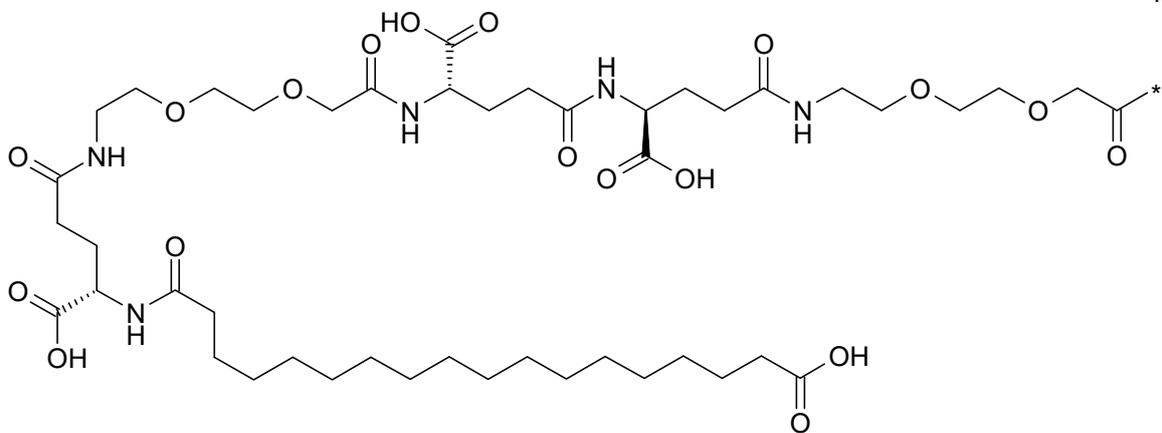
IIIr



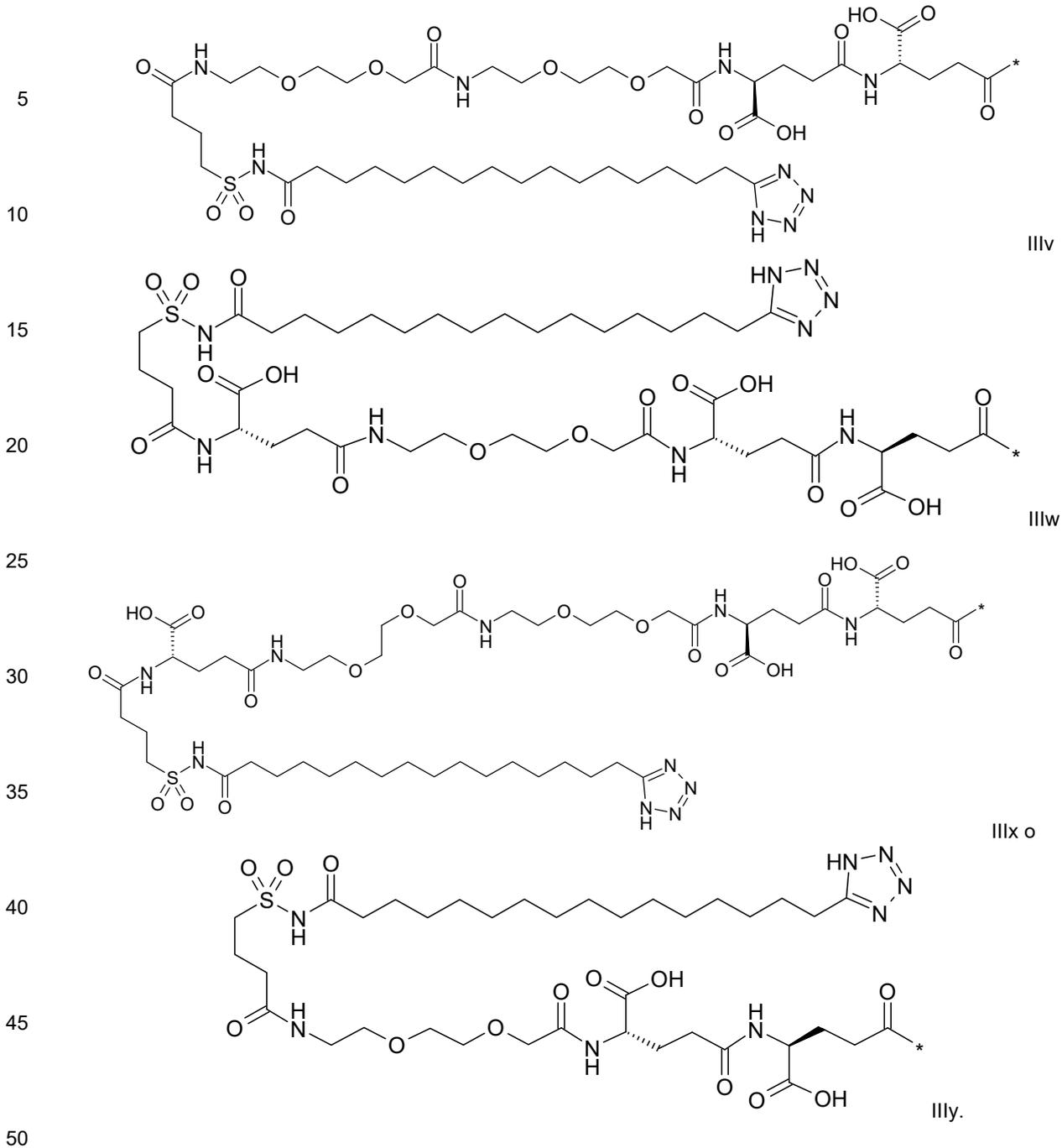
III s



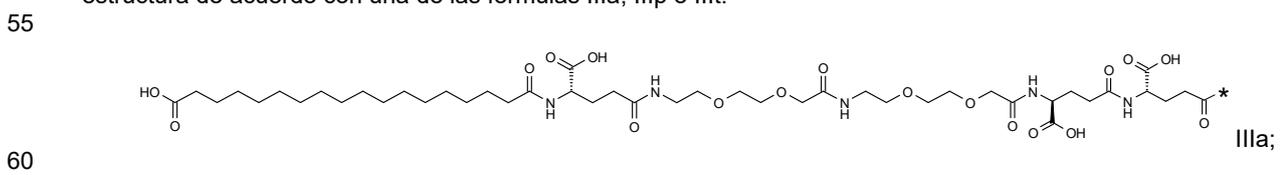
III t

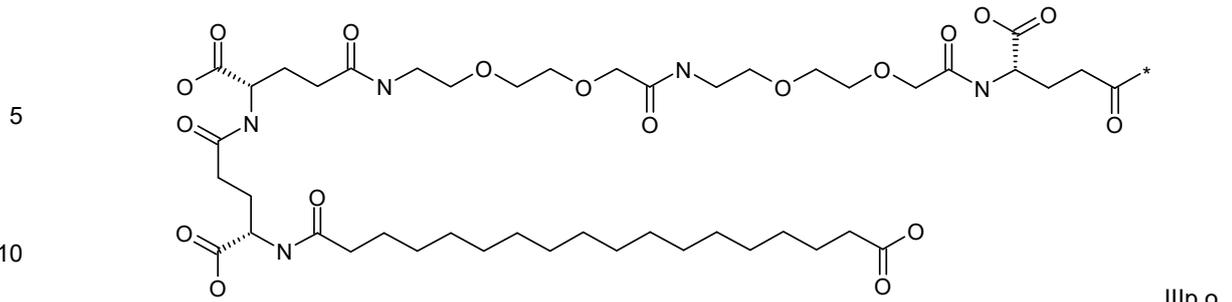


III u

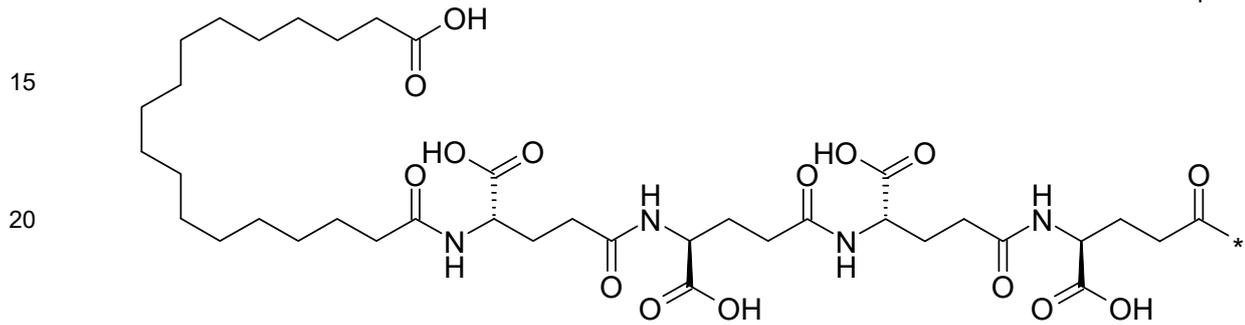


Modalidad 7: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde dicho sustituyente representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIIa, IIIp o IIIt:





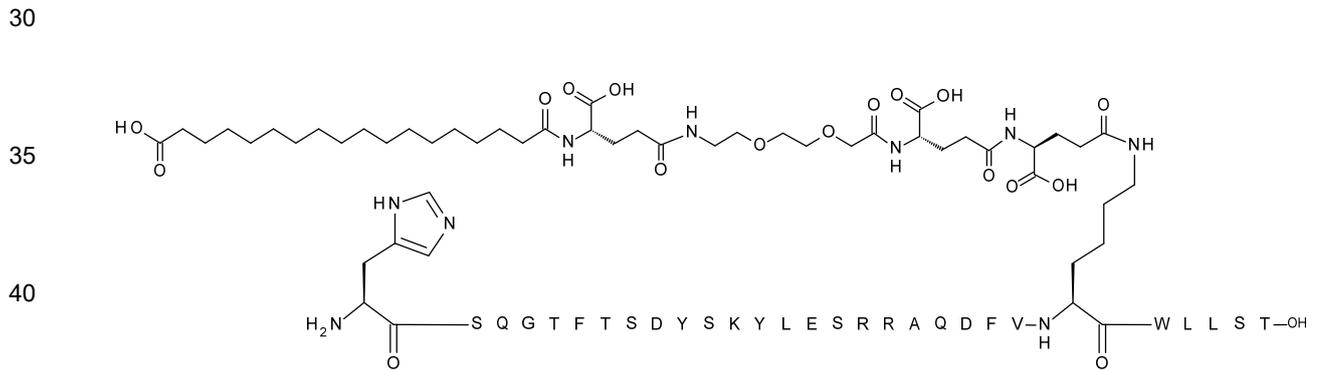
IIIp o



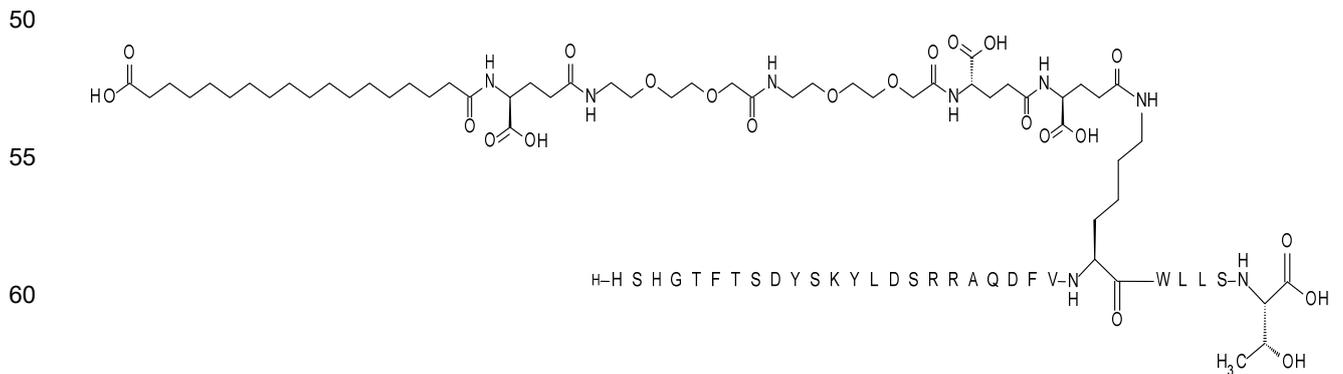
III t.

Modalidad 8: El péptido glucagón de acuerdo con la invención, seleccionado del grupo que consiste en:

Sustancia química 1:

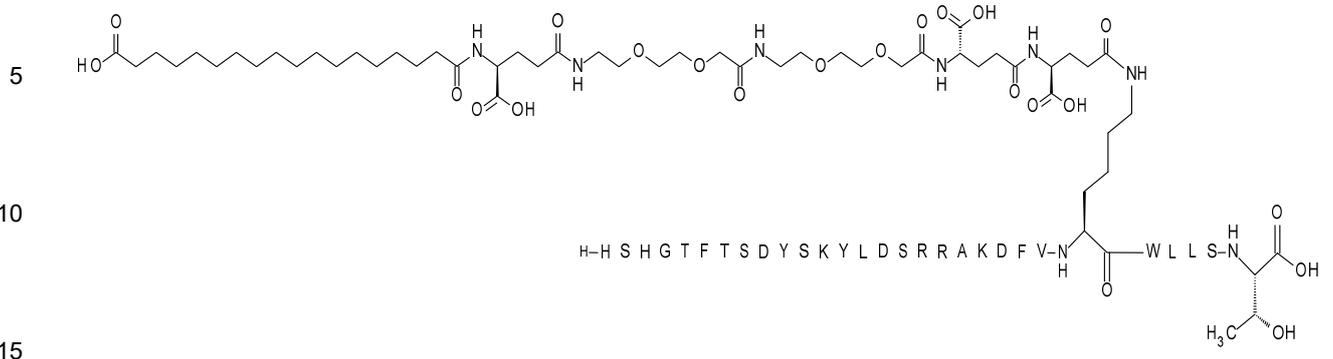


Sustancia química 2:

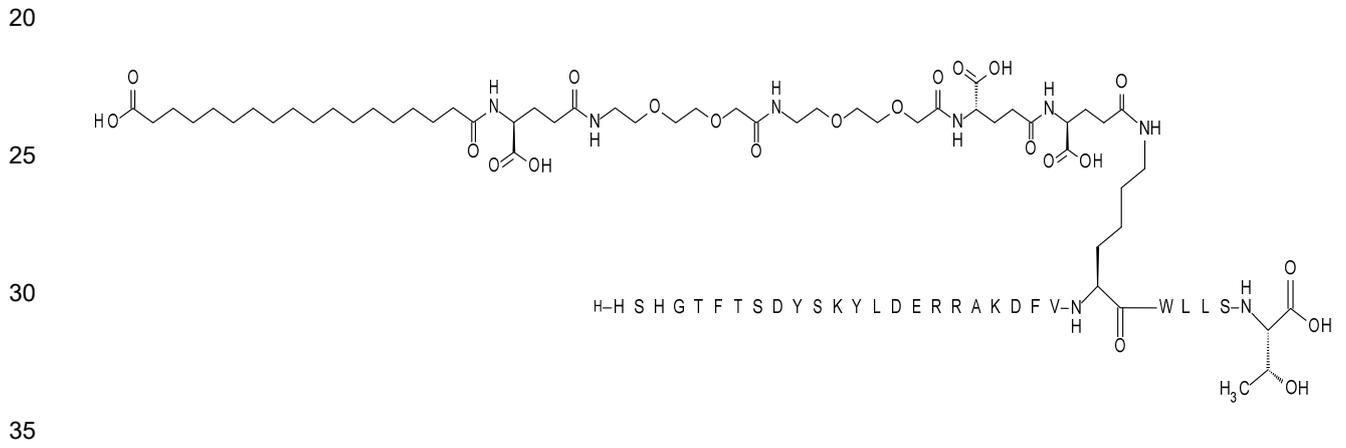


Sustancia química 3:

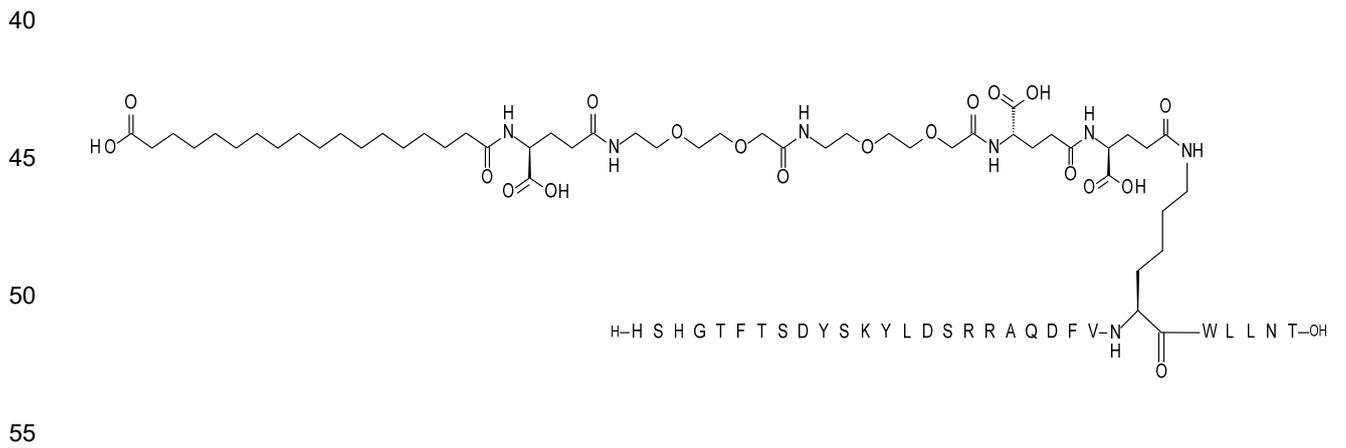
ES 2 767 705 T3



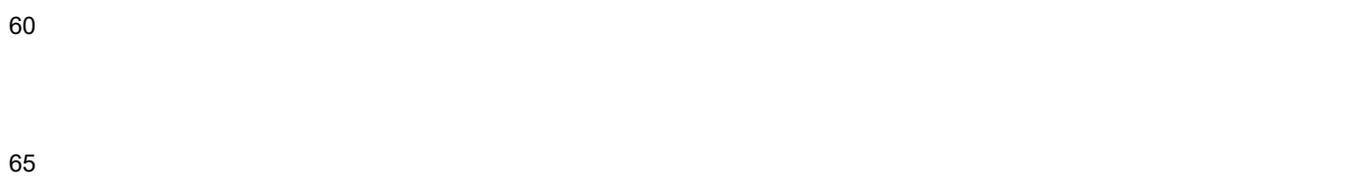
Sustancia química 4:

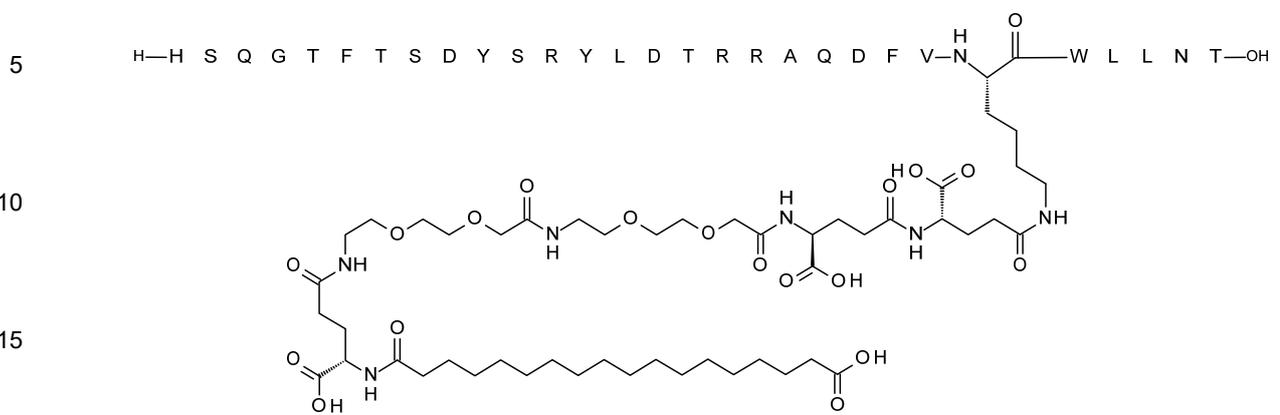


Sustancia química 5:

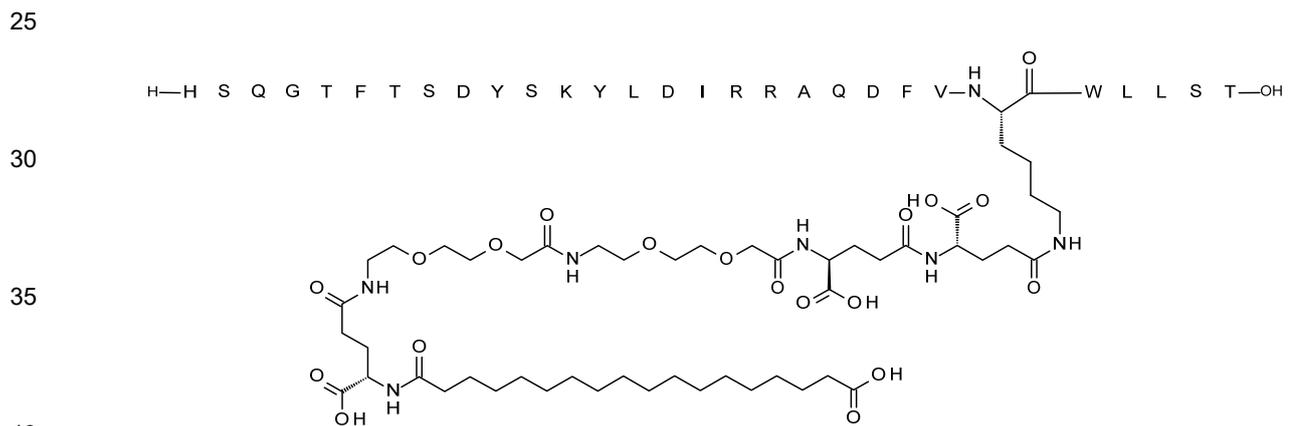


Sustancia química 6:

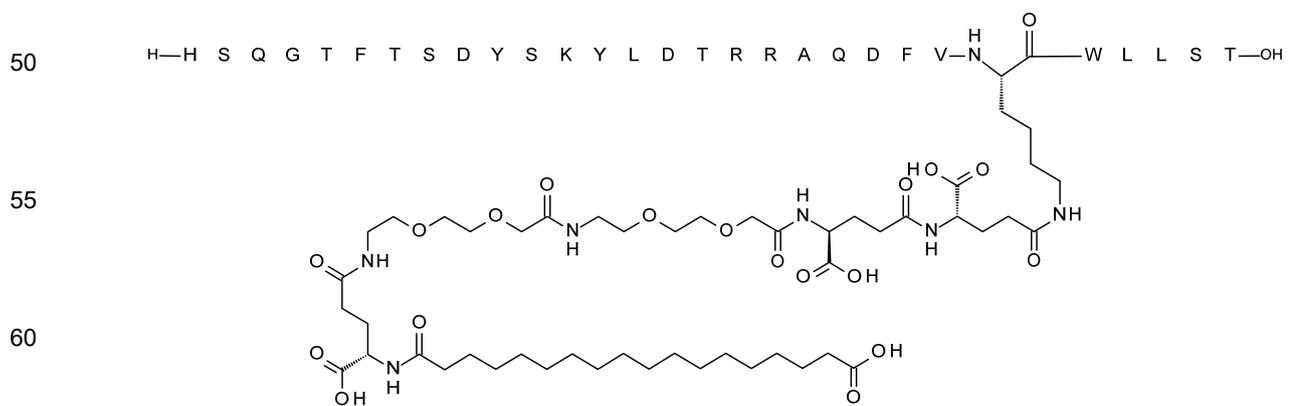




Sustancia química 11:

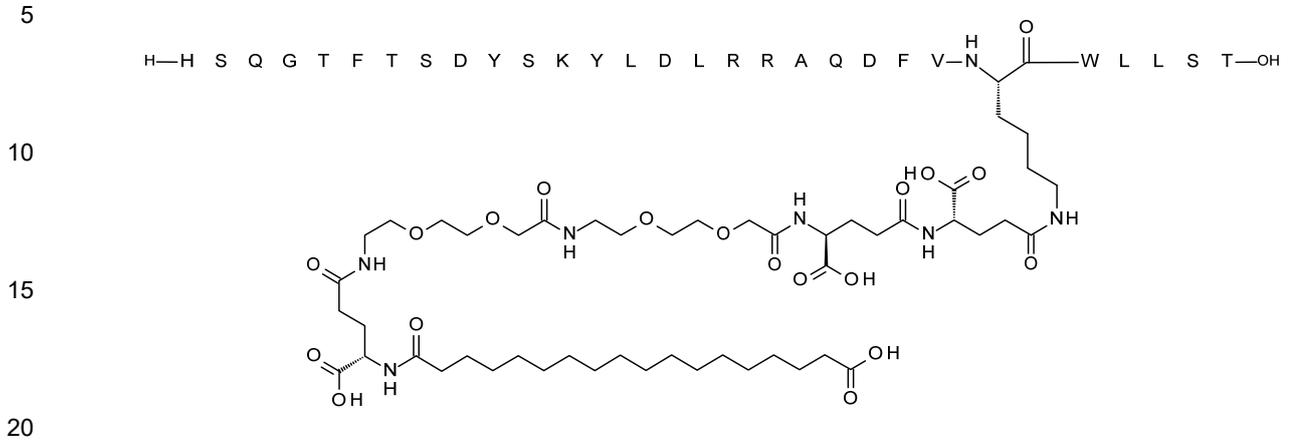


Sustancia química 12:

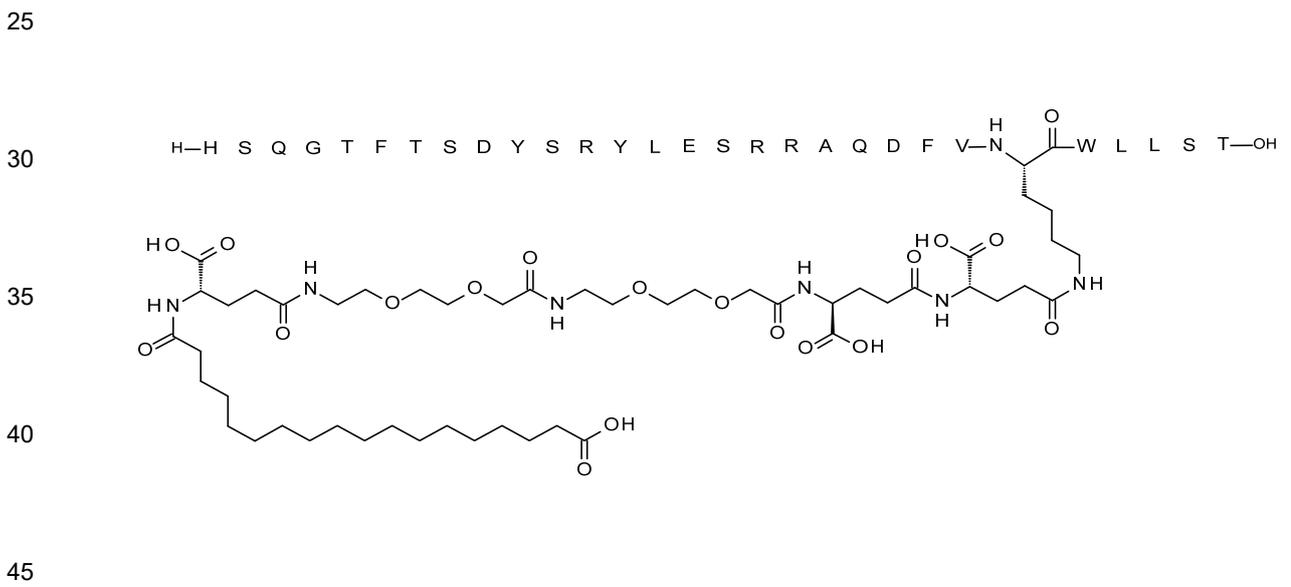


65

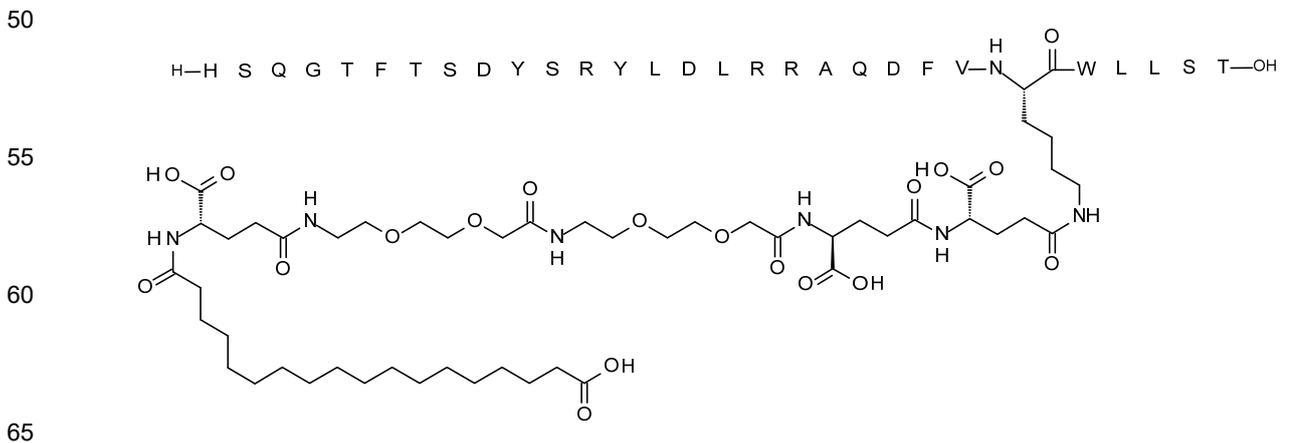
Sustancia química 13:



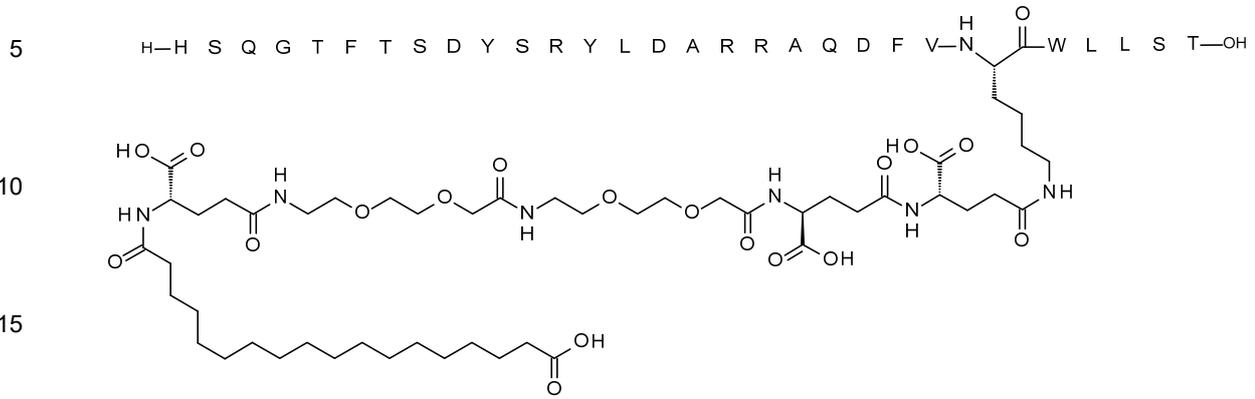
Sustancia química 14:



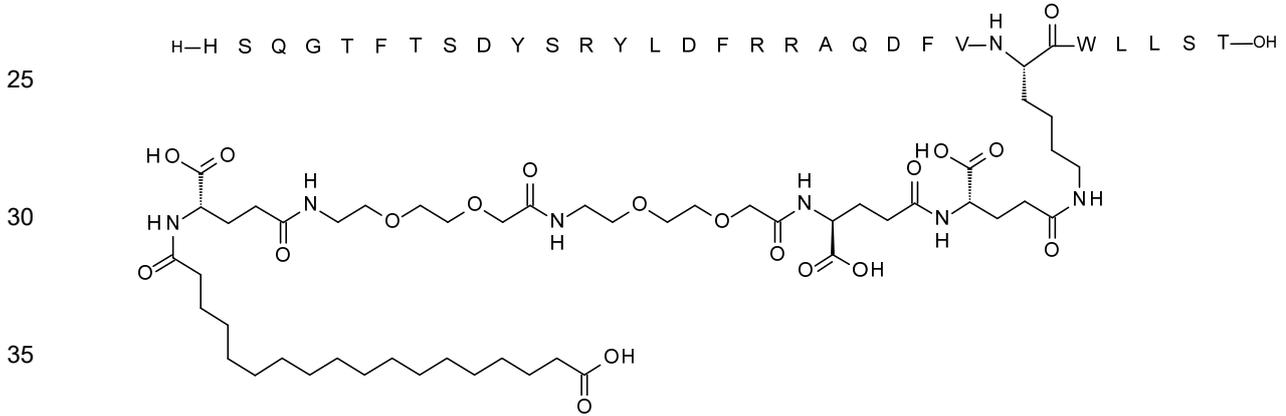
Sustancia química 15:



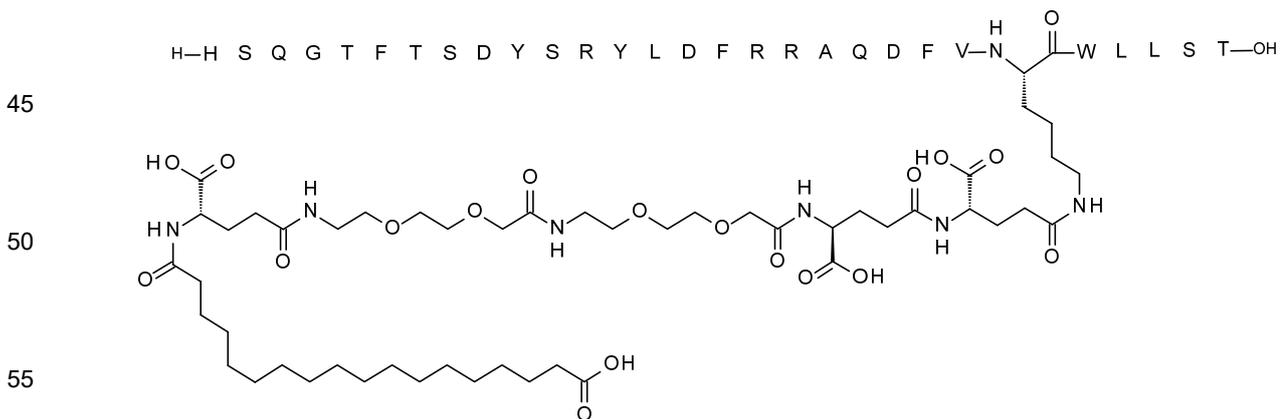
Sustancia química 16:



20 Sustancia química 17:



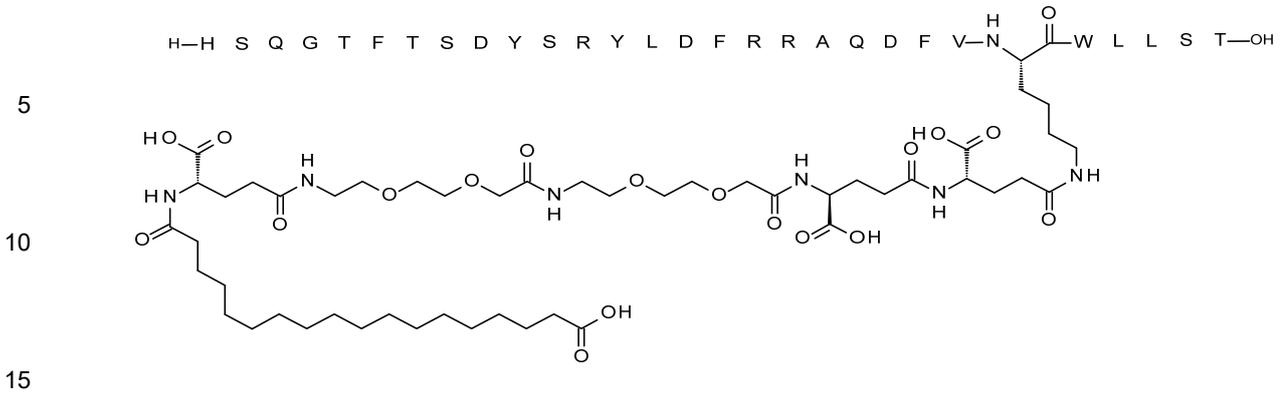
40 Sustancia química 18:



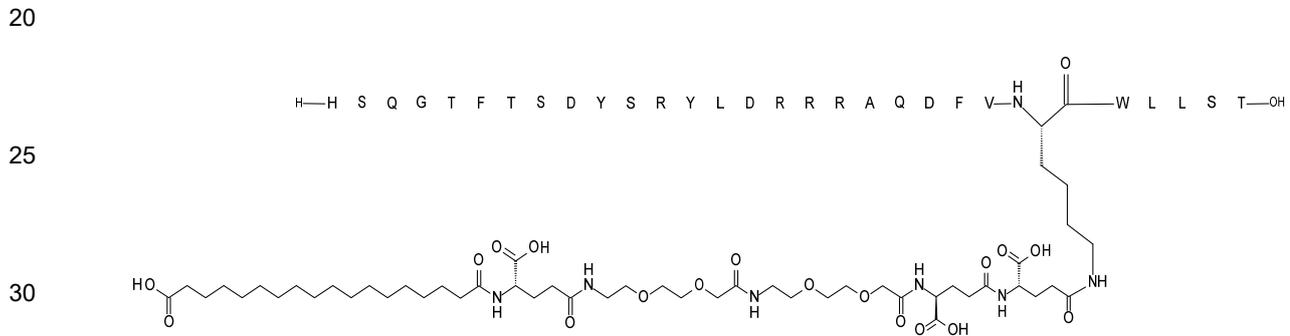
60 Sustancia química 19:

60
65

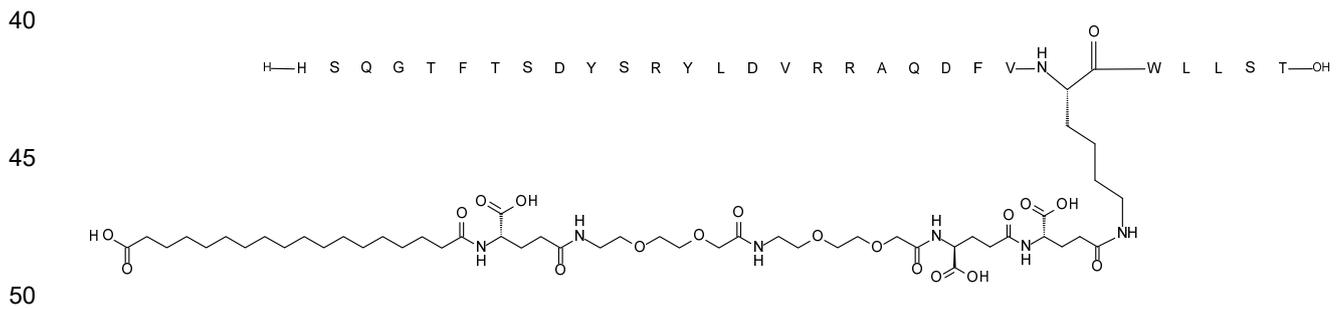
ES 2 767 705 T3



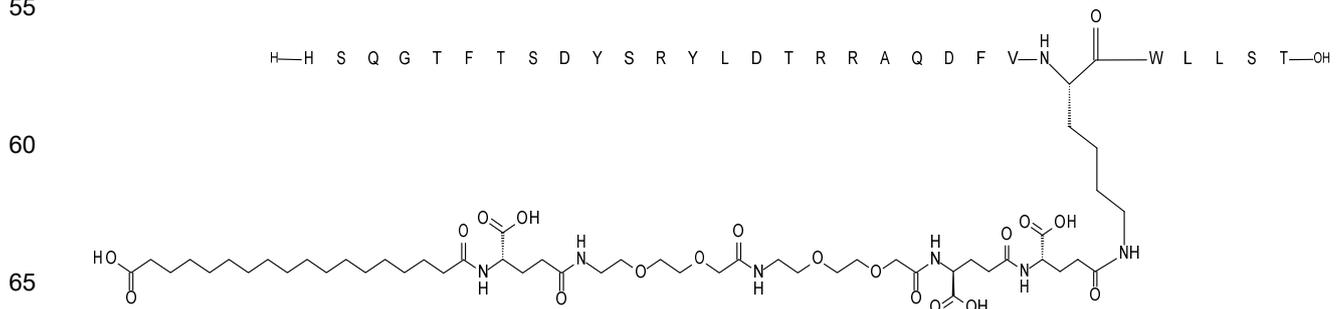
Sustancia química 20:



Sustancia química 21:



Sustancia química 22:



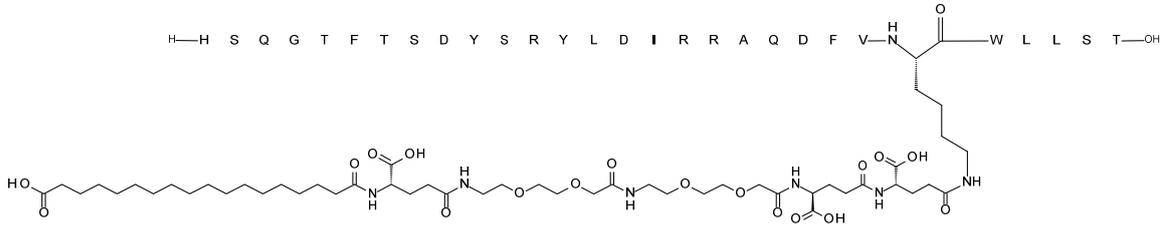
ES 2 767 705 T3

Sustancia química 23:

5

H—H S Q G T F T S D Y S R Y L D I R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

10



15

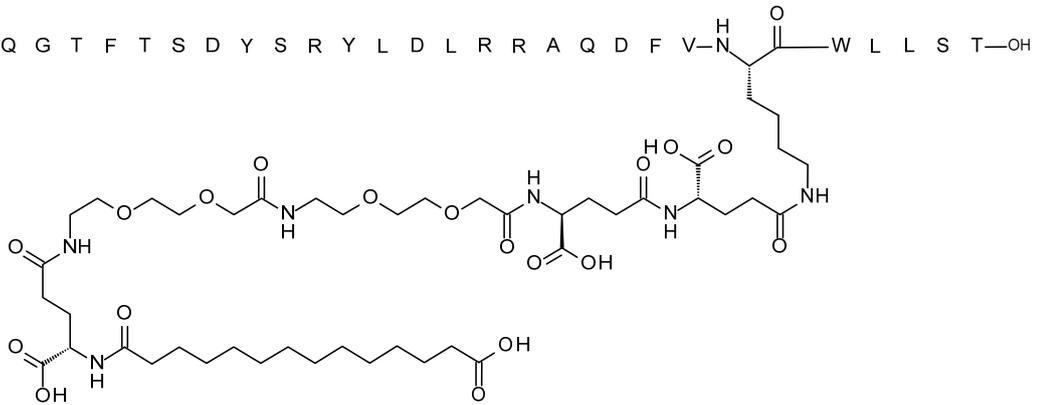
Sustancia química 24

20

H—H S Q G T F T S D Y S R Y L D L R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

25

30



35

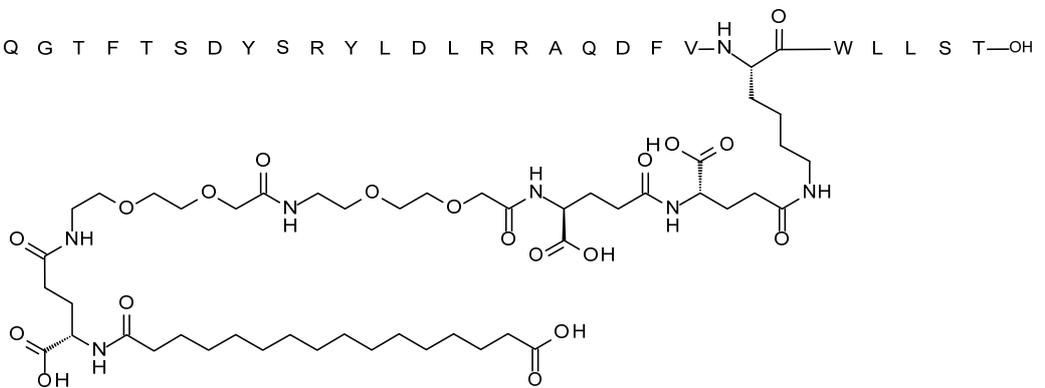
40 Sustancia química 25:

45

H—H S Q G T F T S D Y S R Y L D L R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

50

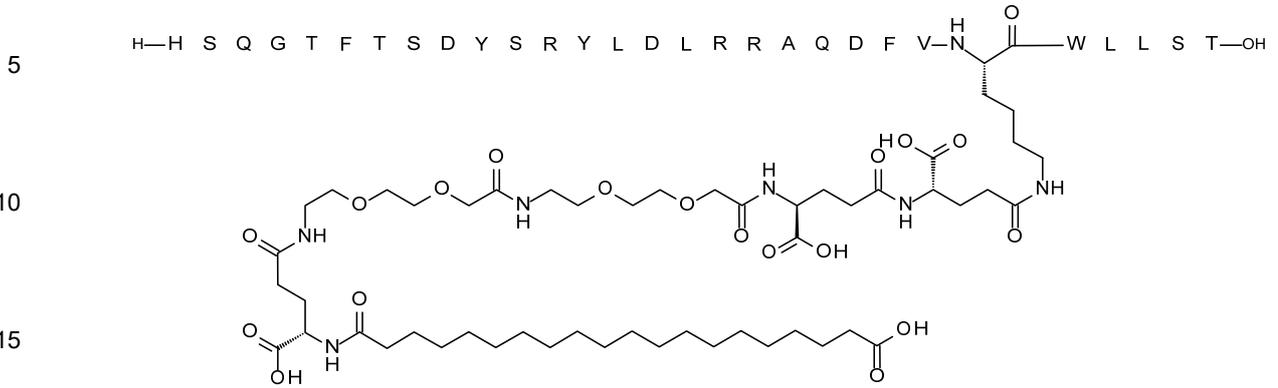
55



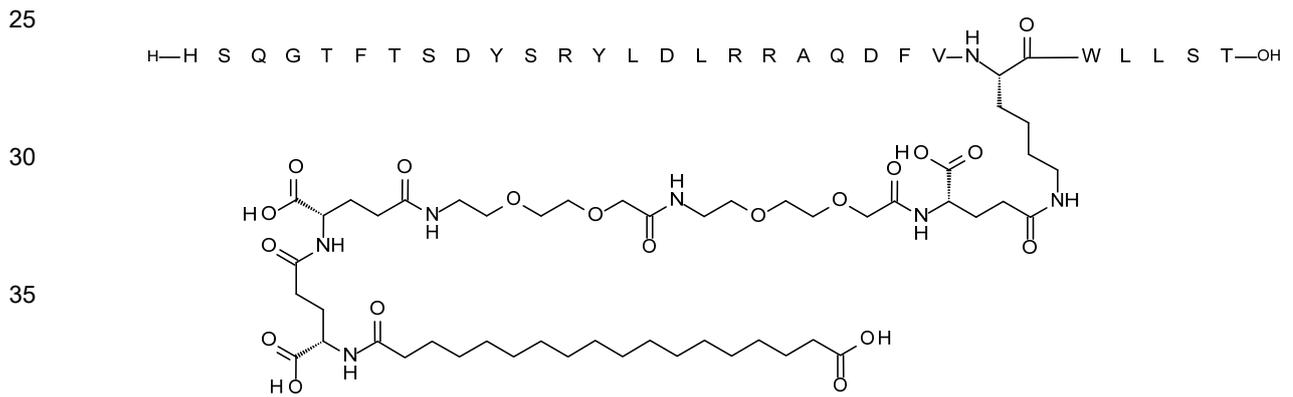
60

Sustancia química 26:

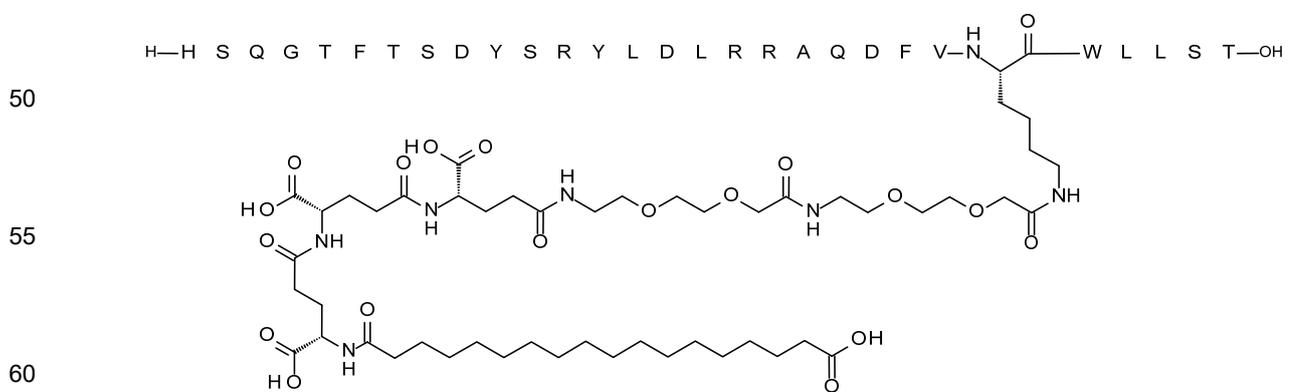
65



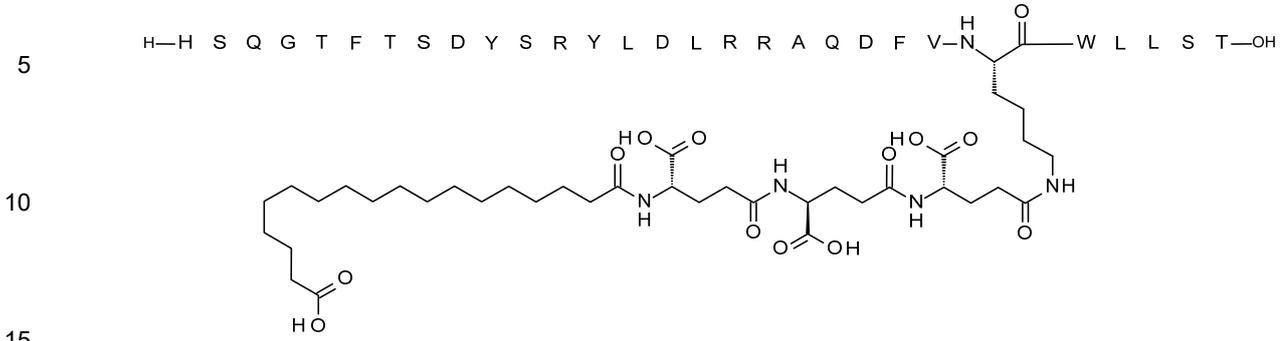
Sustancia química 27:



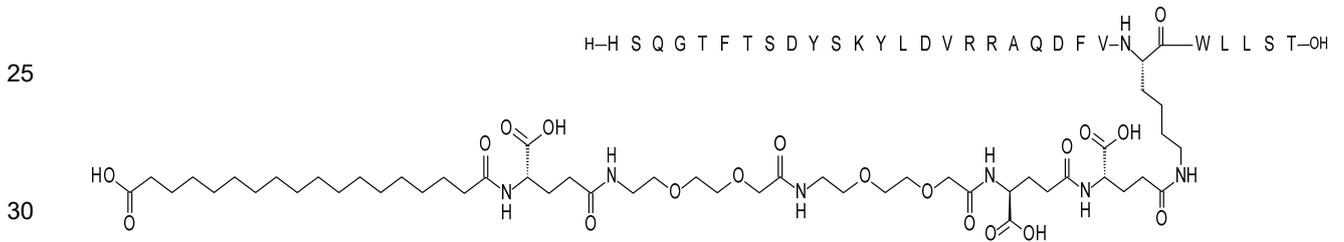
Sustancia química 28:



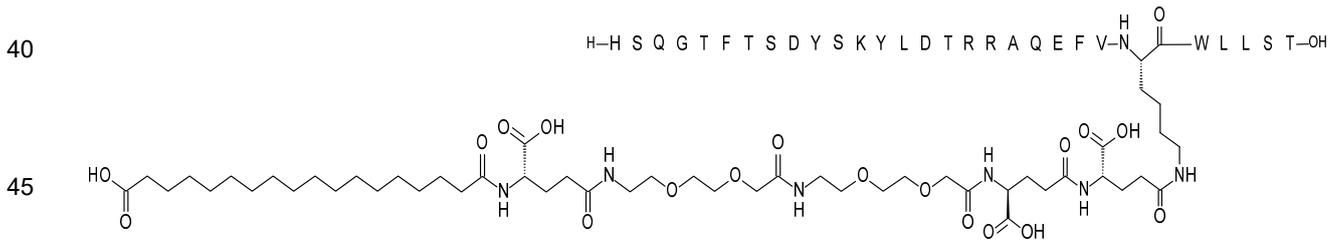
Sustancia química 29:



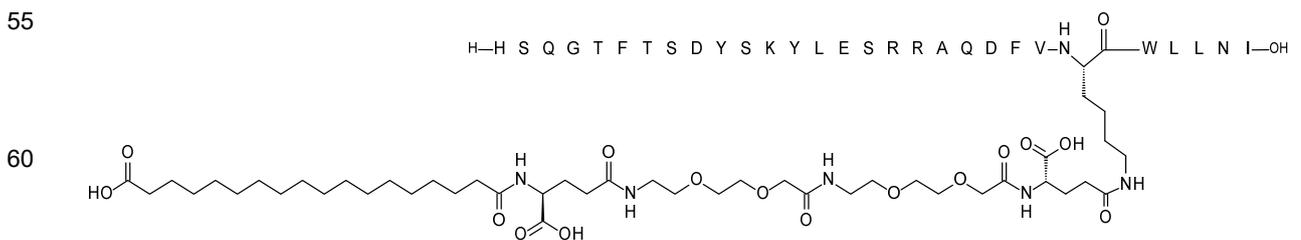
Sustancia química 30:



Sustancia química 31:



Sustancia química 32:

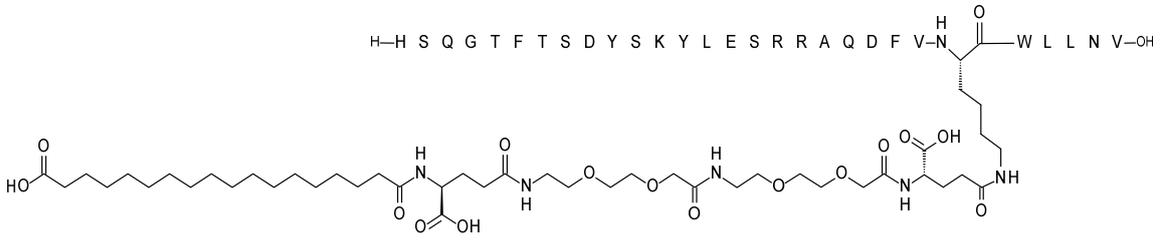


65

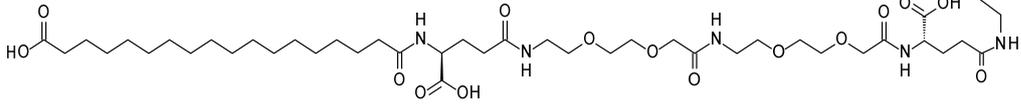
ES 2 767 705 T3

Sustancia química 33:

5

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V-N  W L L N V-OH

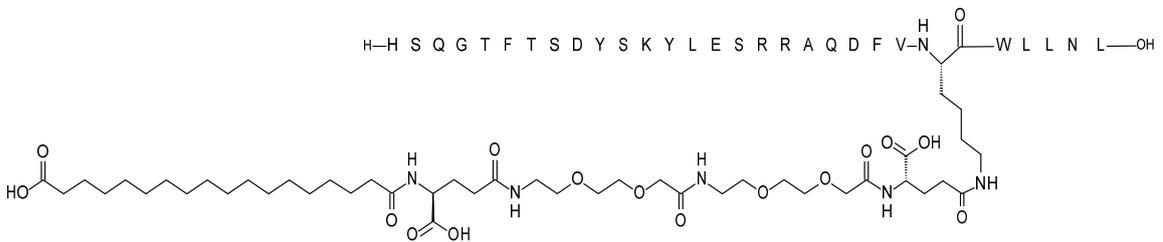
10



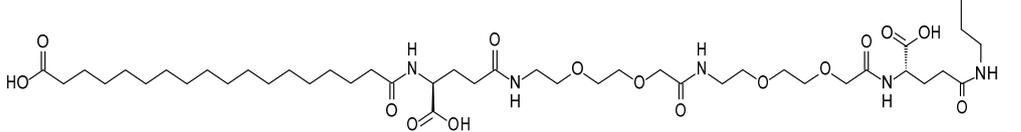
15

Sustancia química 34:

20

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V-N  W L L N L-OH

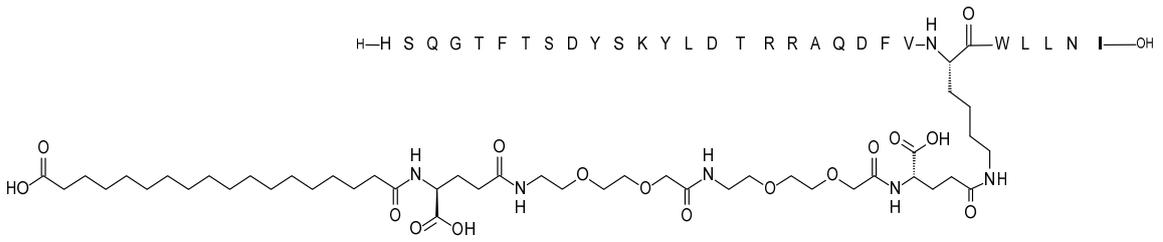
25



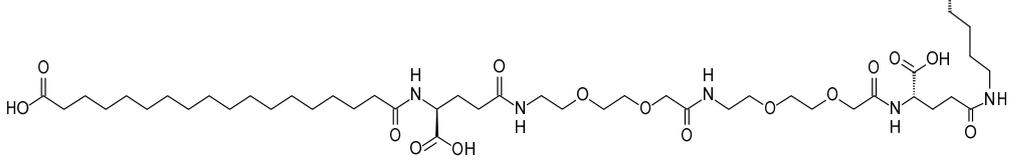
30

Sustancia química 35:

35

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D T R R A Q D F V-N  W L L N I-OH

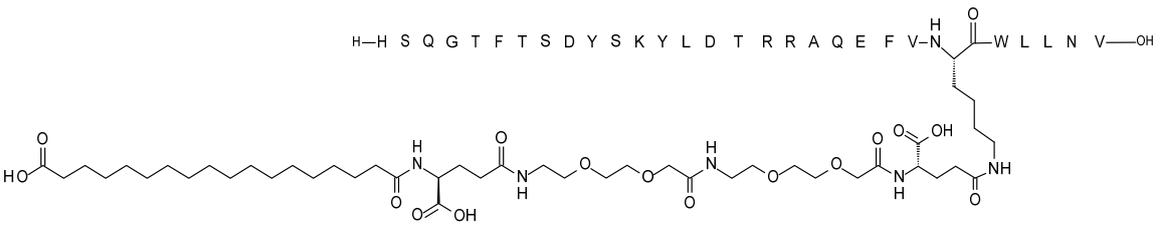
40



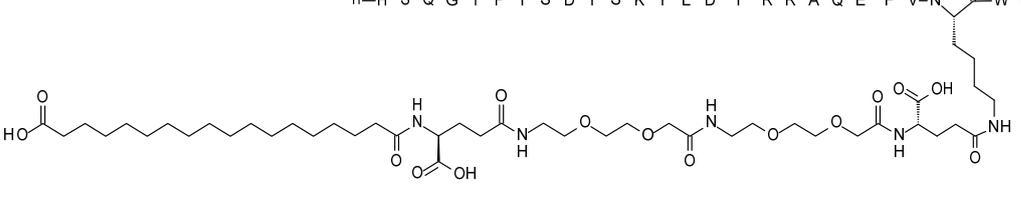
45

Sustancia química 36:

50

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D T R R A Q E F V-N  W L L N V-OH

55



60

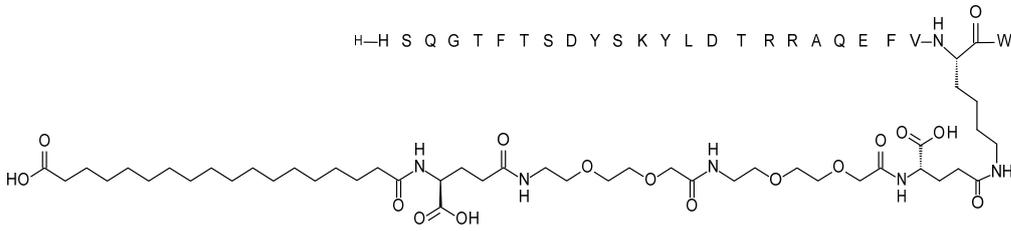
65 Sustancia química 37:

ES 2 767 705 T3

5



10

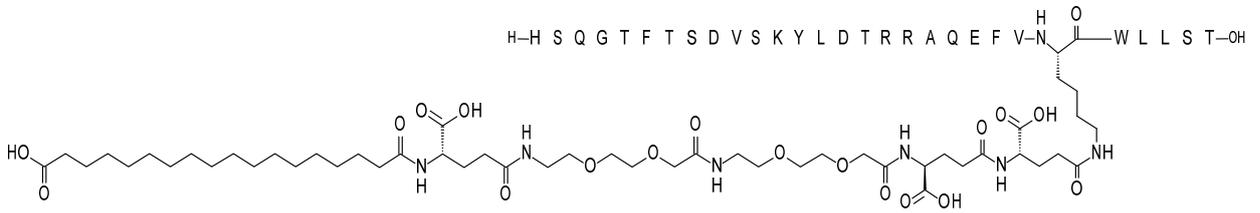


15 Sustancia química 38:

20



25

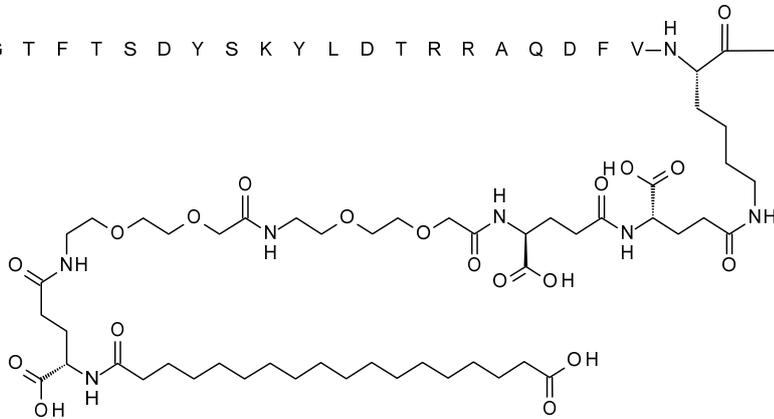


30 Sustancia química 39:

35



40



45

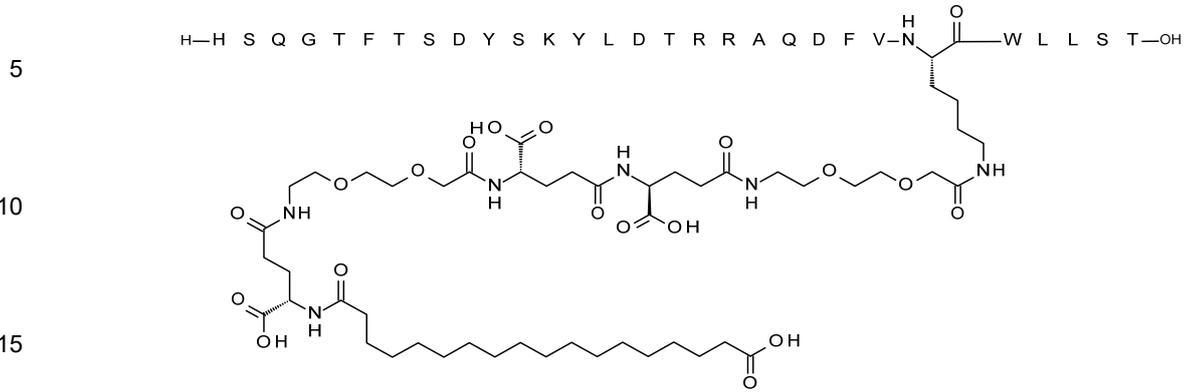
50

Sustancia química 40:

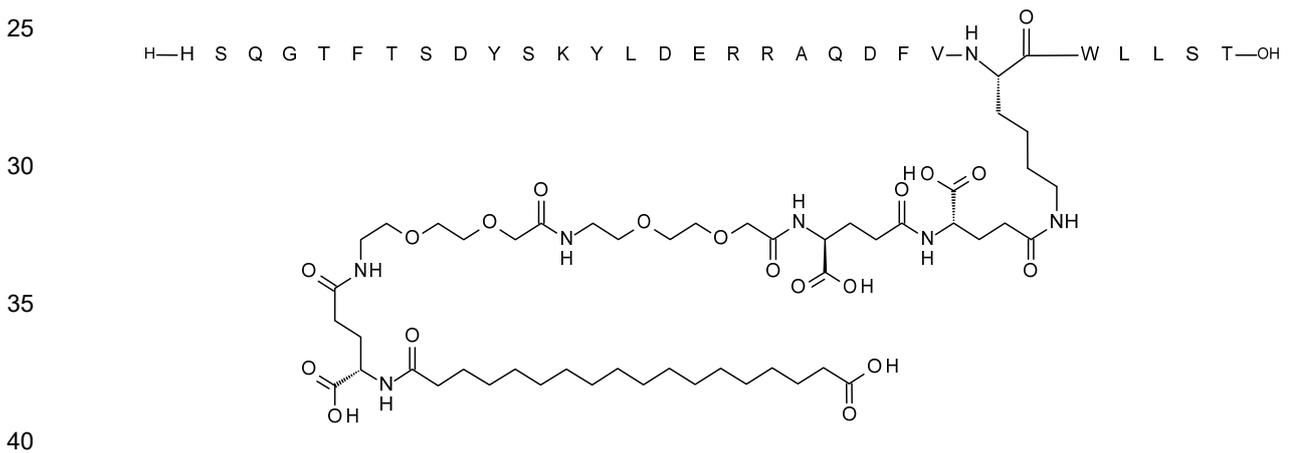
55

60

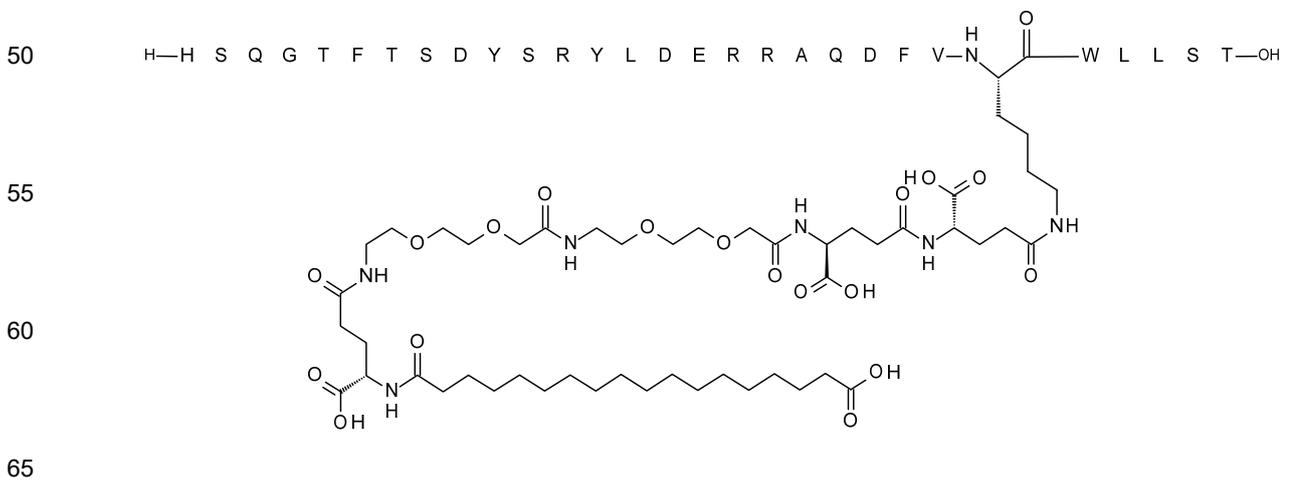
65



20 Sustancia química 41:



45 Sustancia química 42:



Sustancia química 43:

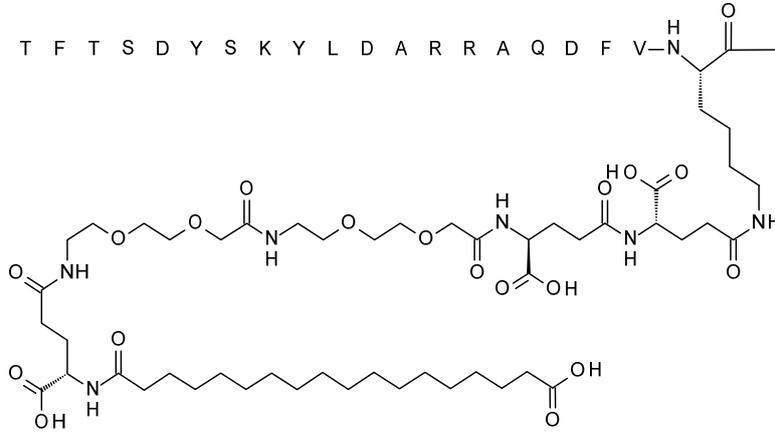
5



10

15

20



25

Sustancia química 44:

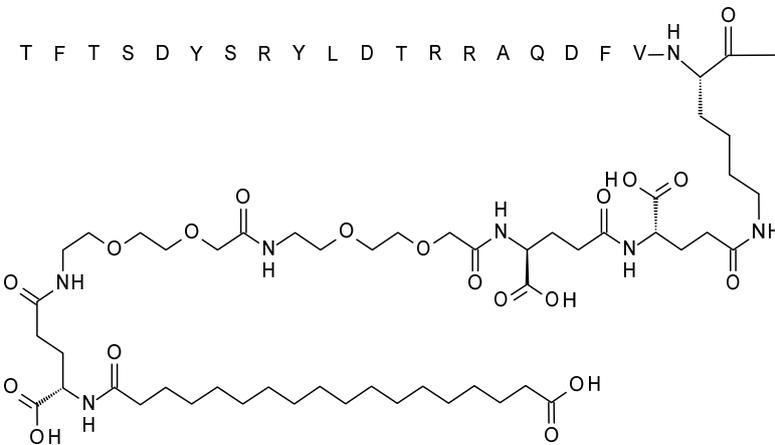
30



35

40

45



50

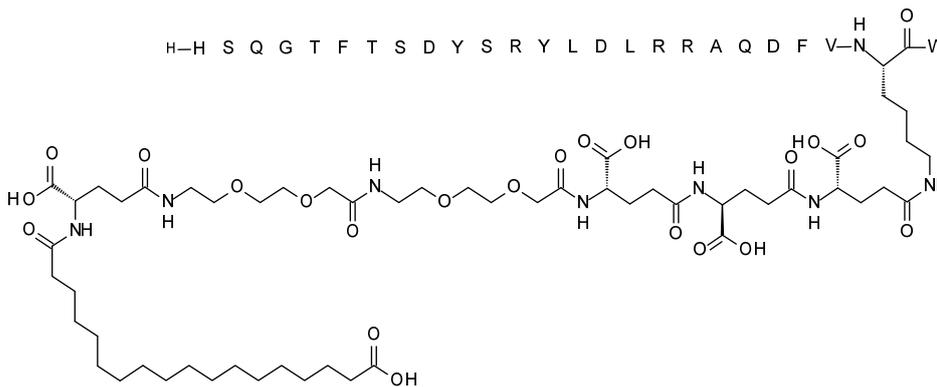
Sustancia química 45:

55

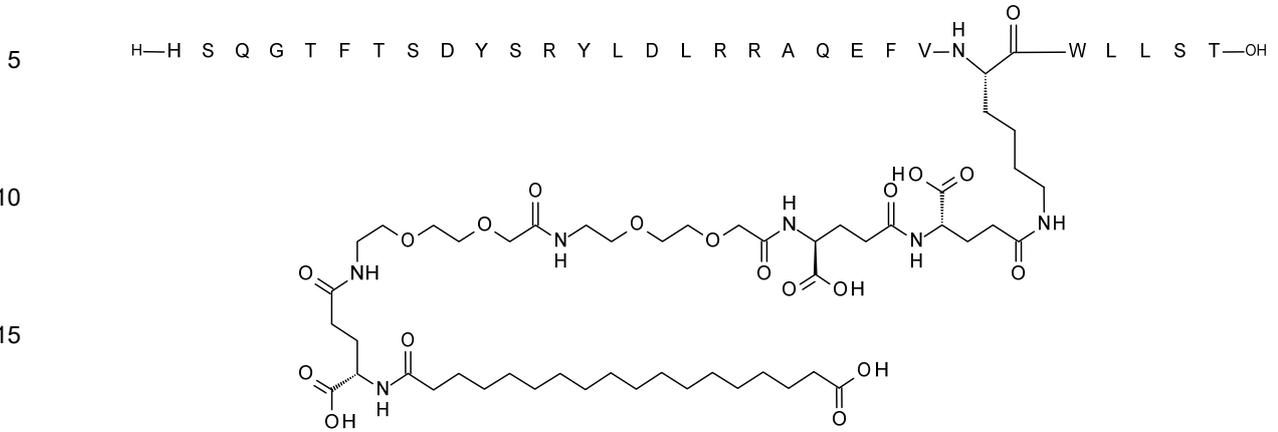


60

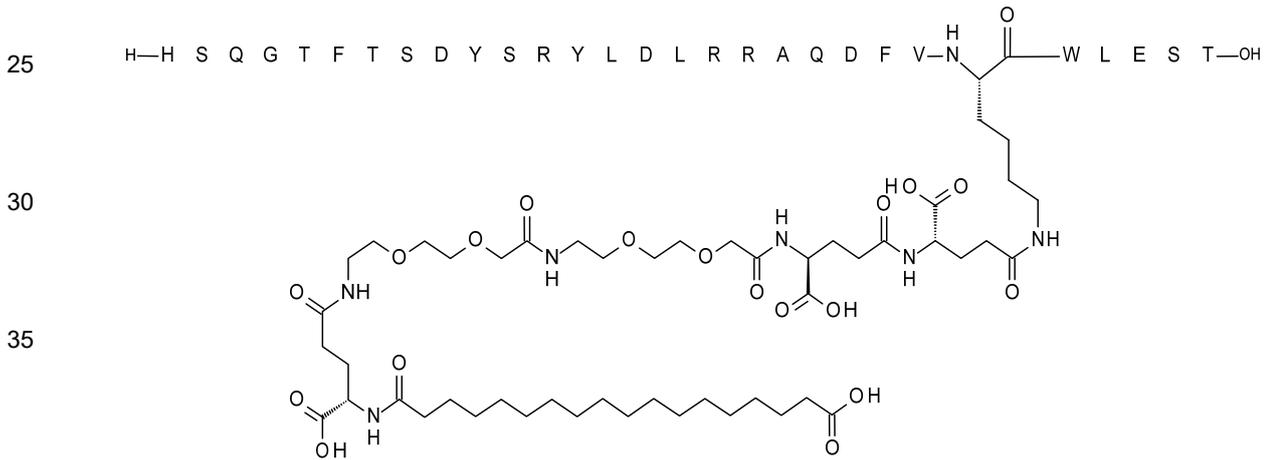
65



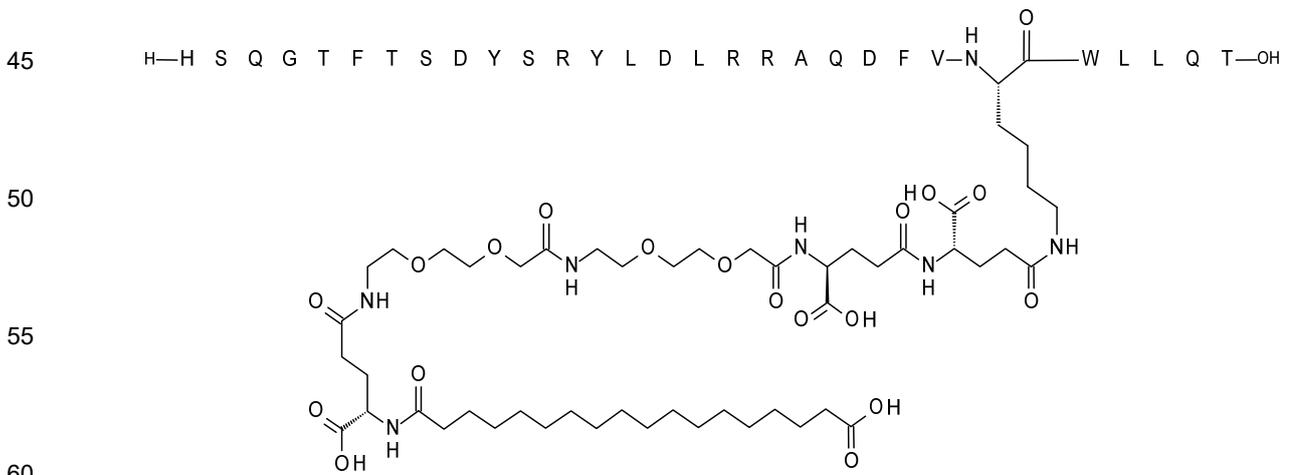
Sustancia química 46:



Sustancia química 47:

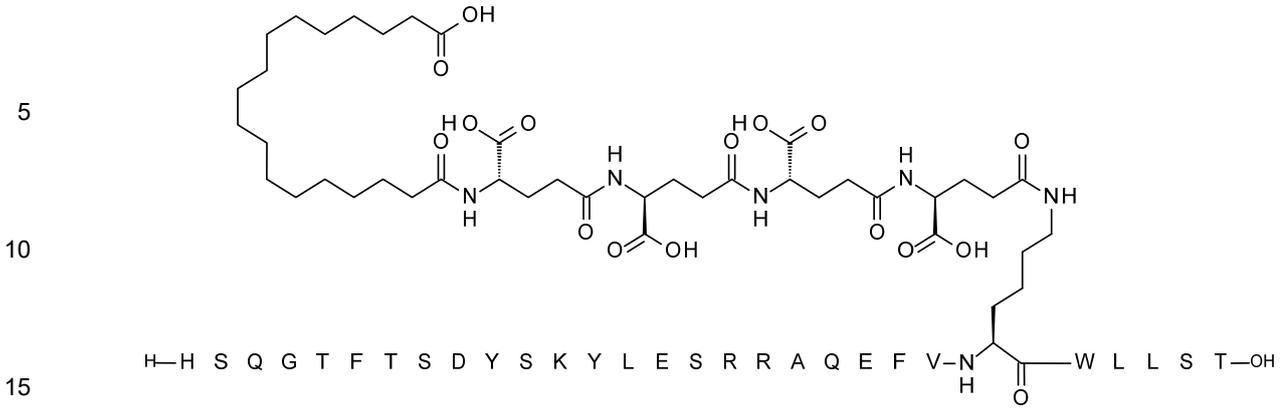


Sustancia química 48:

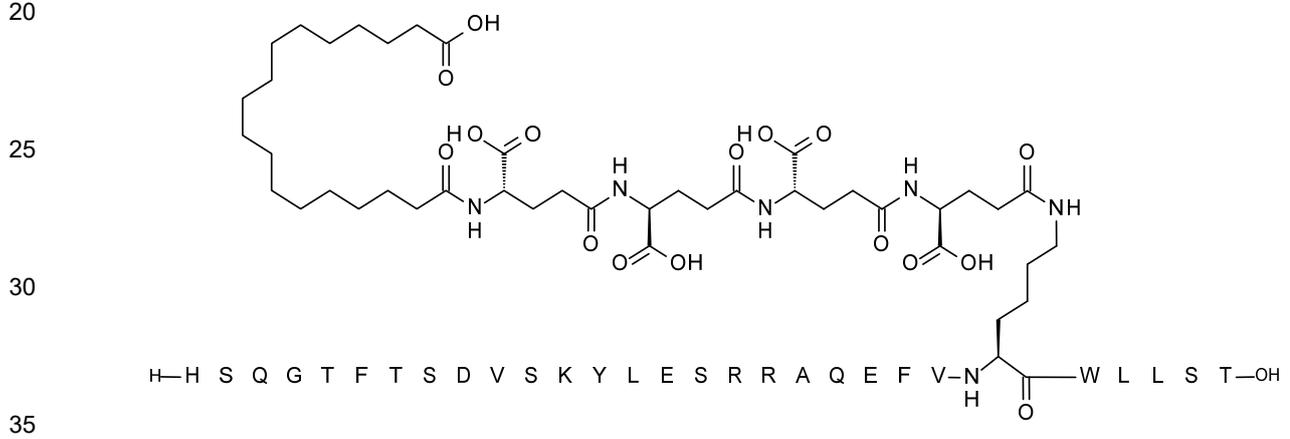


Sustancia química 49:

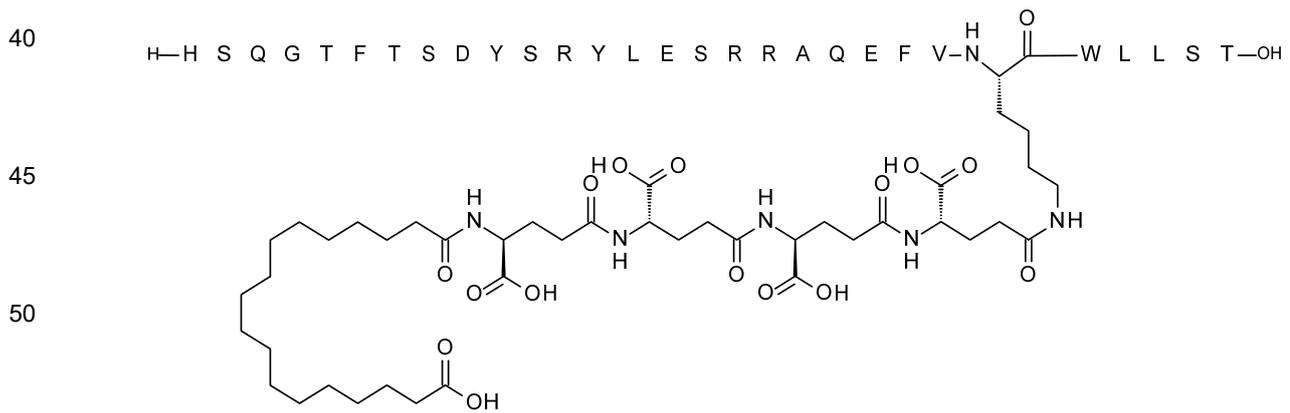
65



Sustancia química 50:



Sustancia química 51:



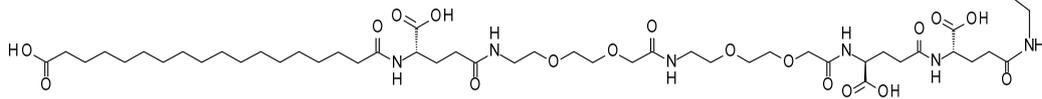
Sustancia química 52:



5



10



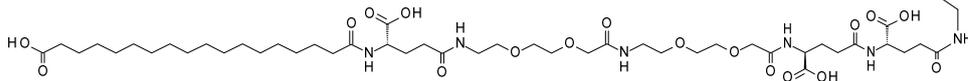
15

Sustancia química 53:

20



25



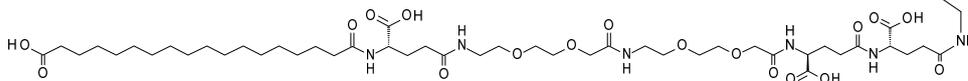
30

Sustancia química 54:

35



40



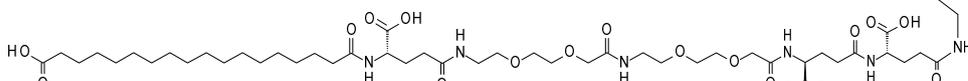
45

Sustancia química 55:

50



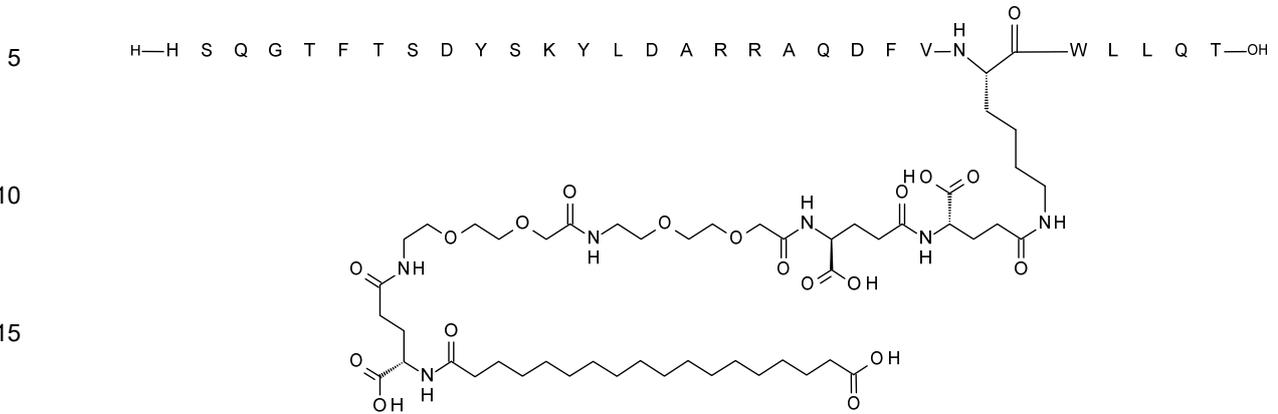
55



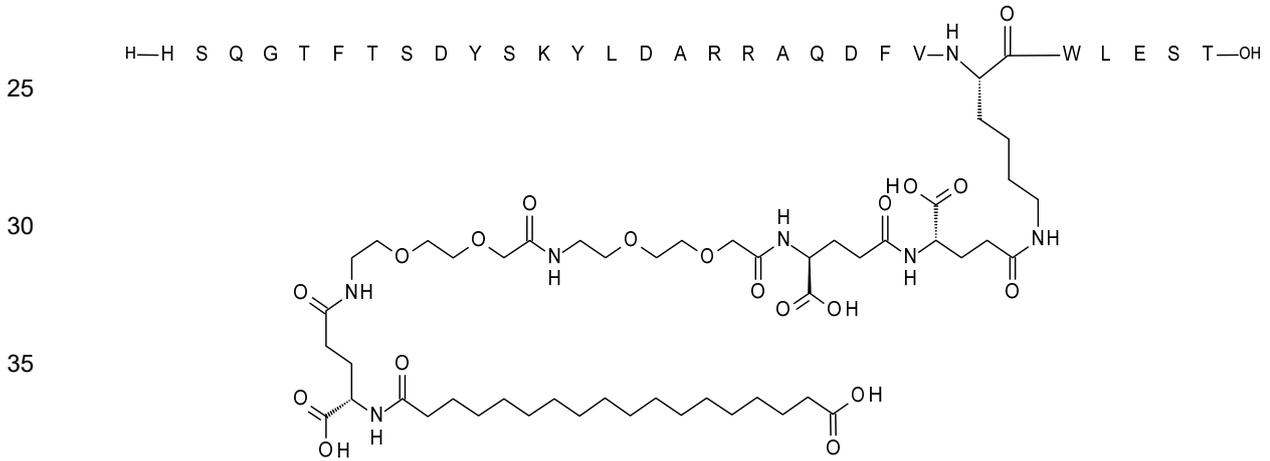
60

65

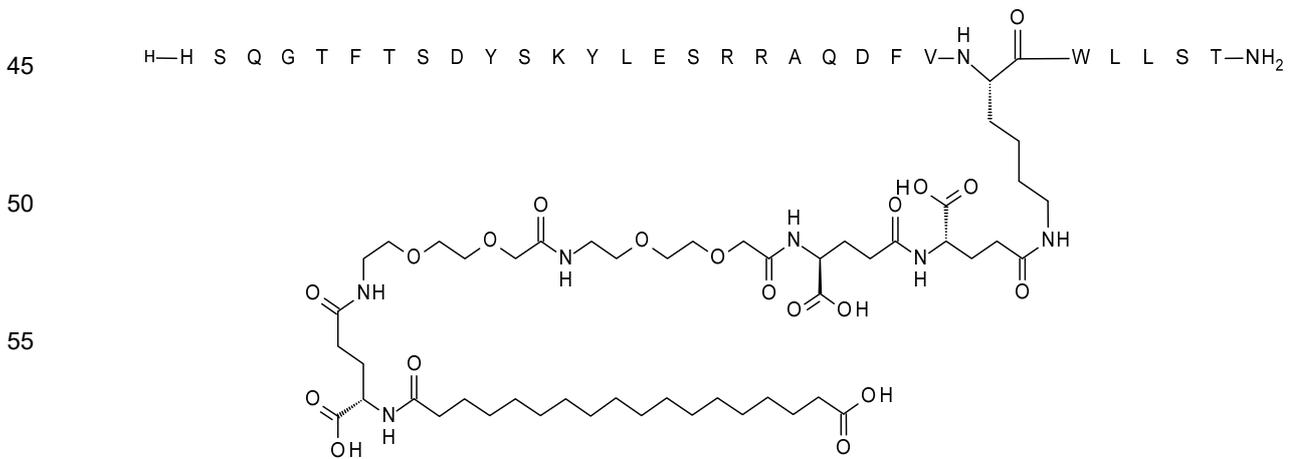
Sustancia química 56:



20 Sustancia química 57:

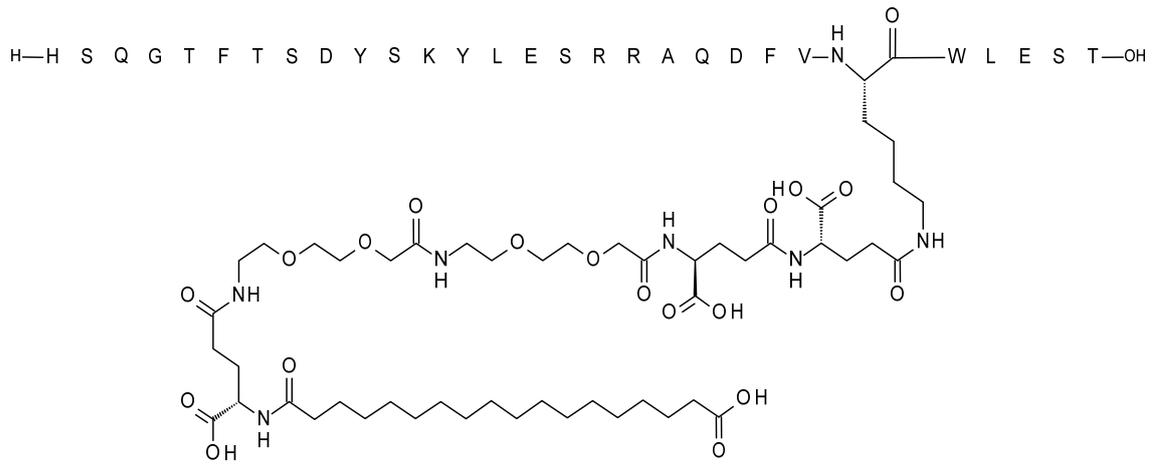


40 Sustancia química 58:

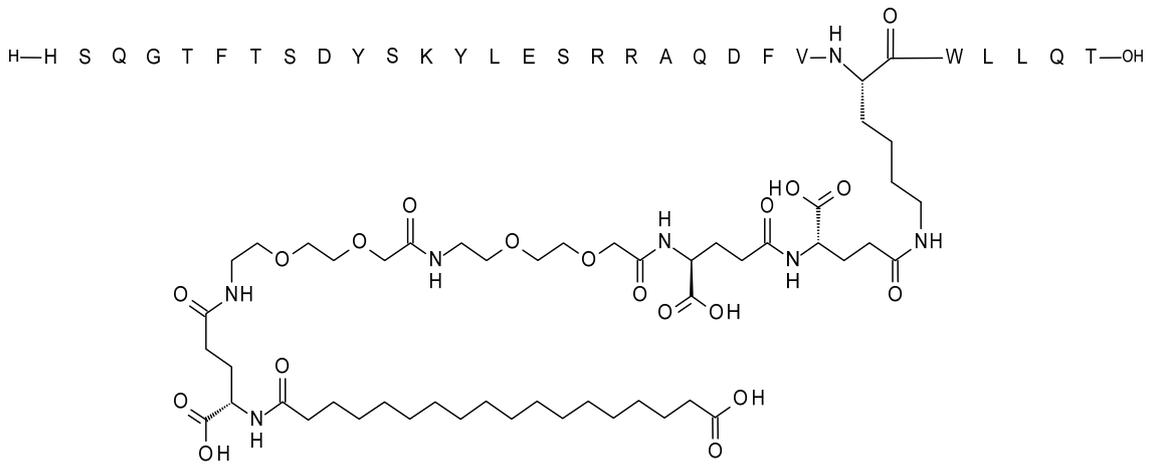


60 Sustancia química 59:

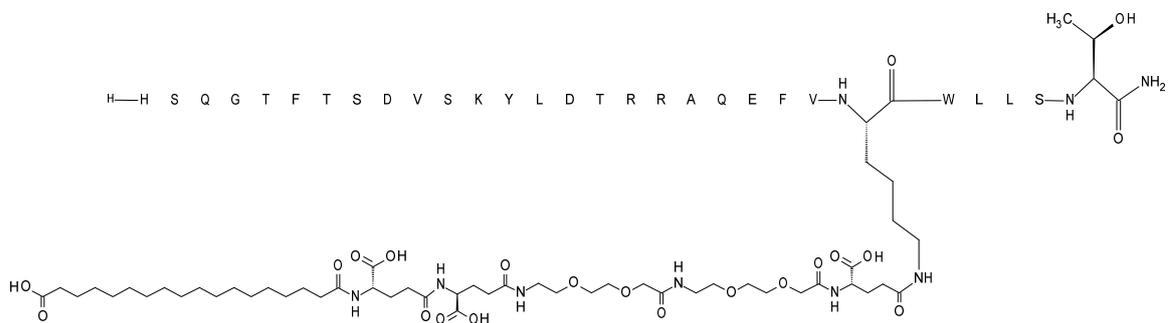
65



20 Sustancia química 60:



40 Sustancia química 61:



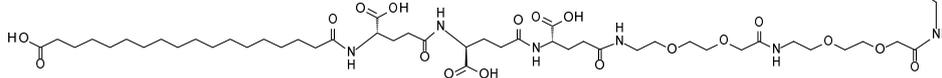
60 Sustancia química 62:

65

5



10

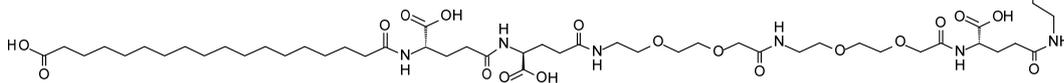


15 Sustancia química 63:

20



25

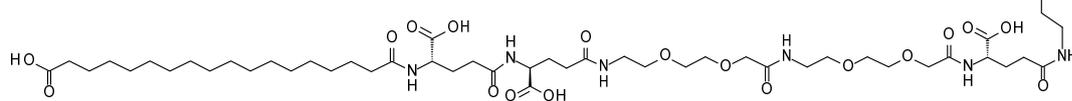


Sustancia química 64:

30



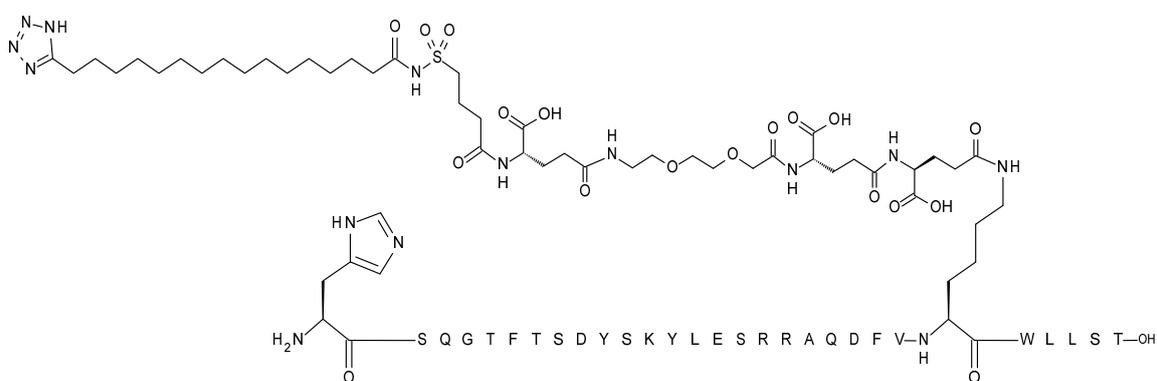
40



45

Sustancia química 65:

50

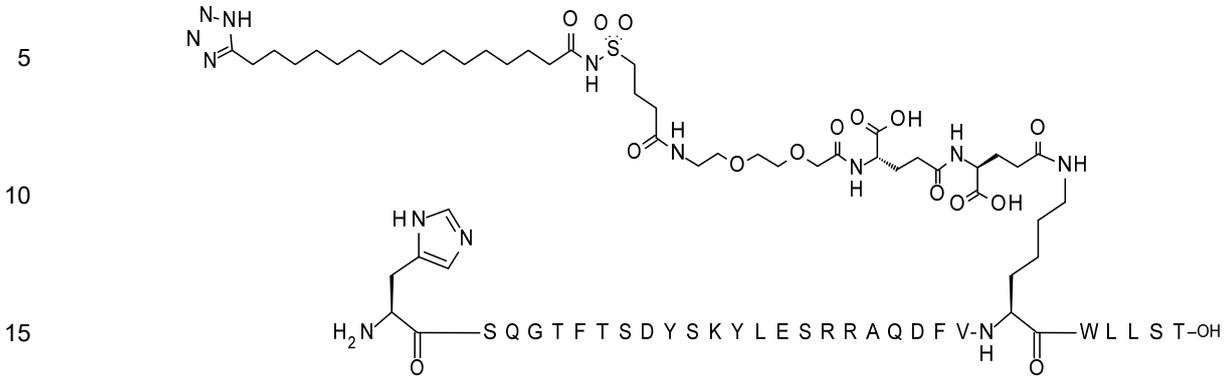


55

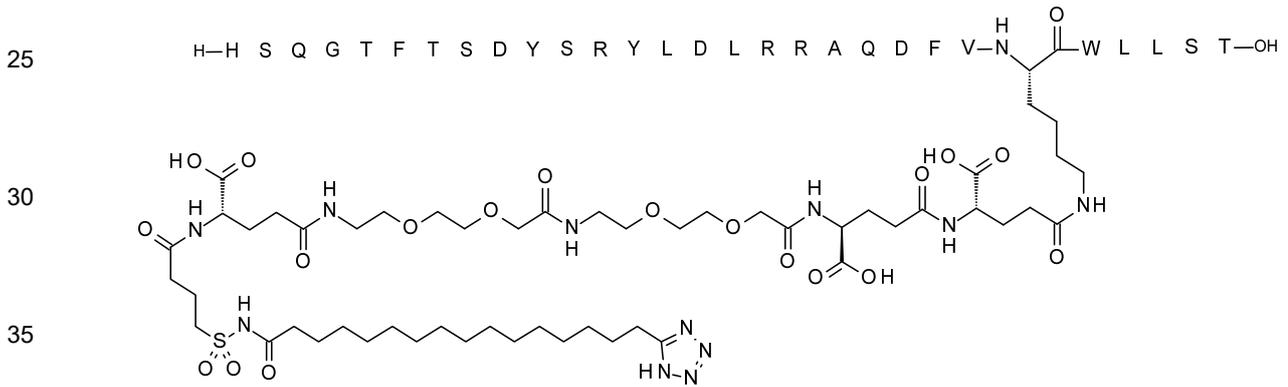
60

65

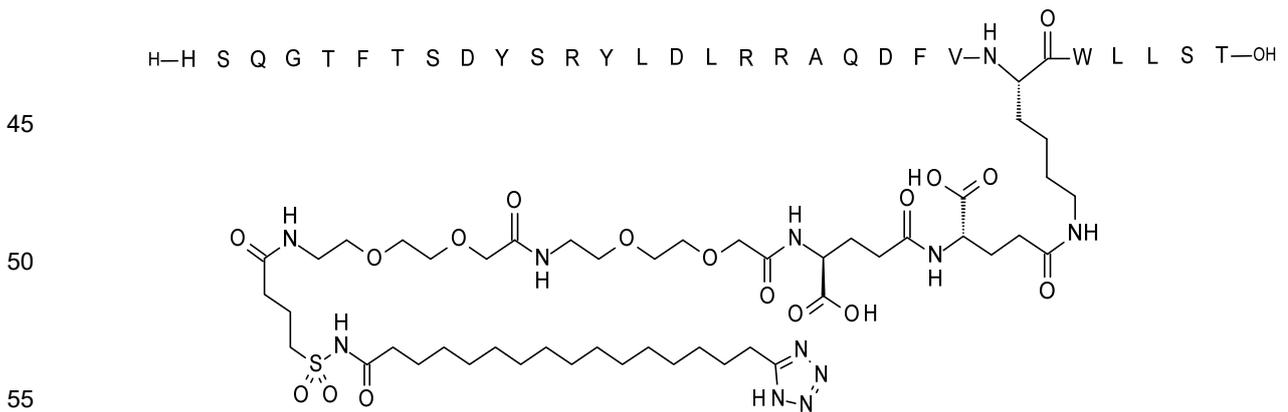
Sustancia química 66:



Sustancia química 67:



Sustancia química 68:



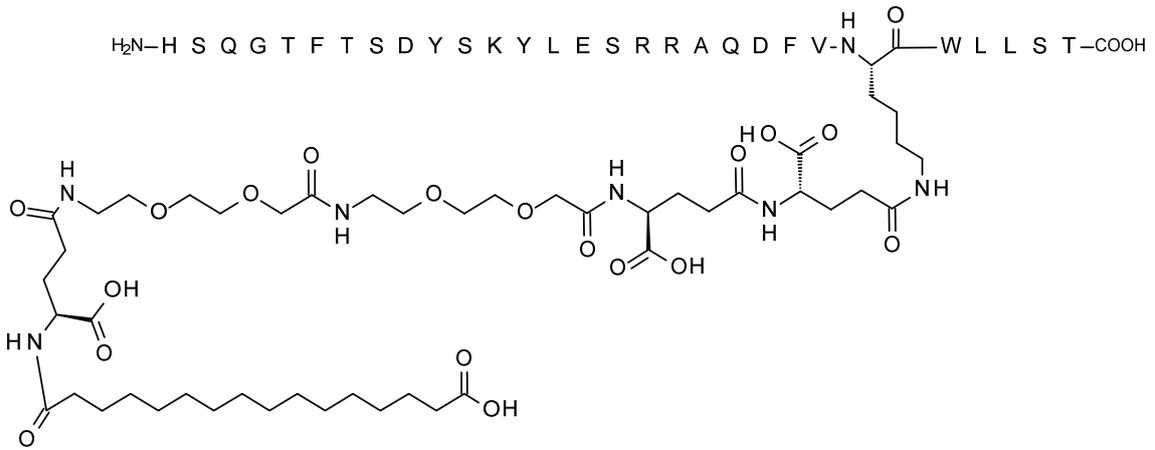
Sustancia química 69:



5

10

15



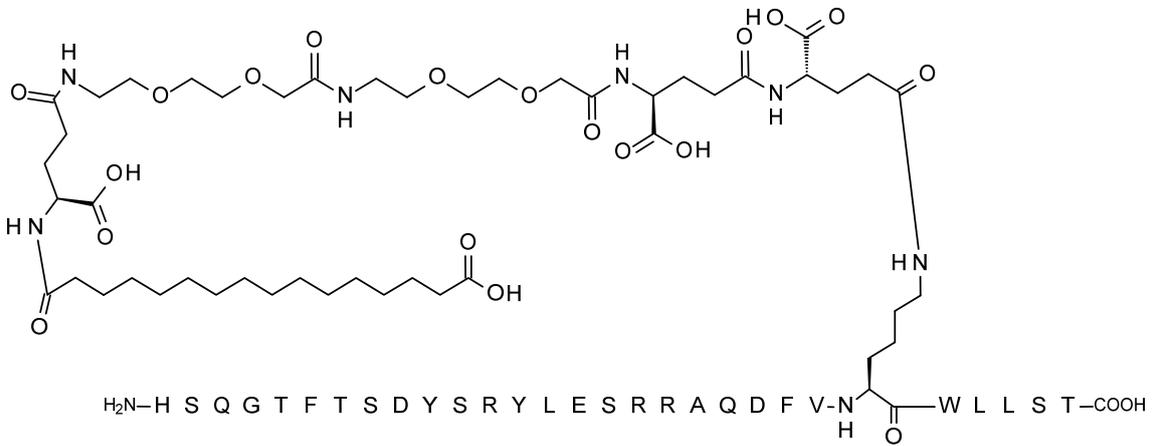
Sustancia química 70:

20

25

30

35



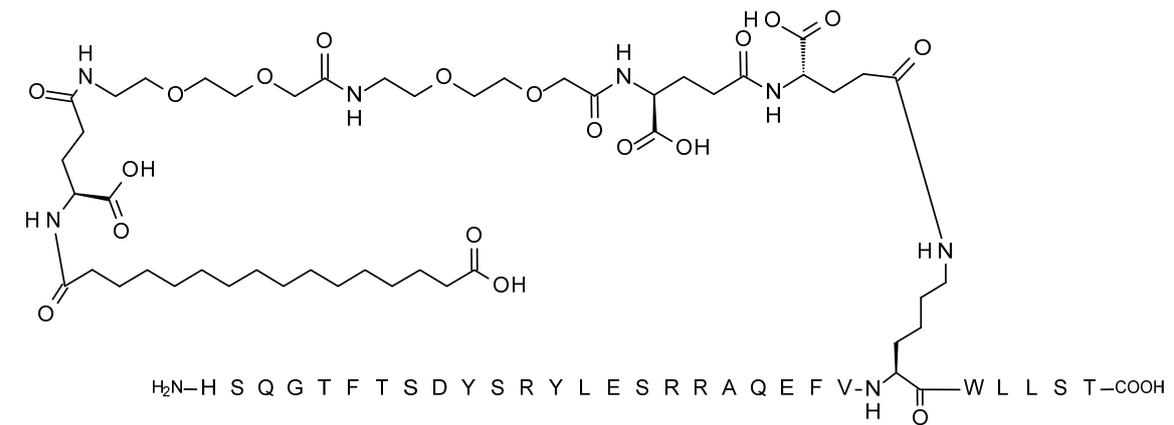
Sustancia química 71:

40

45

50

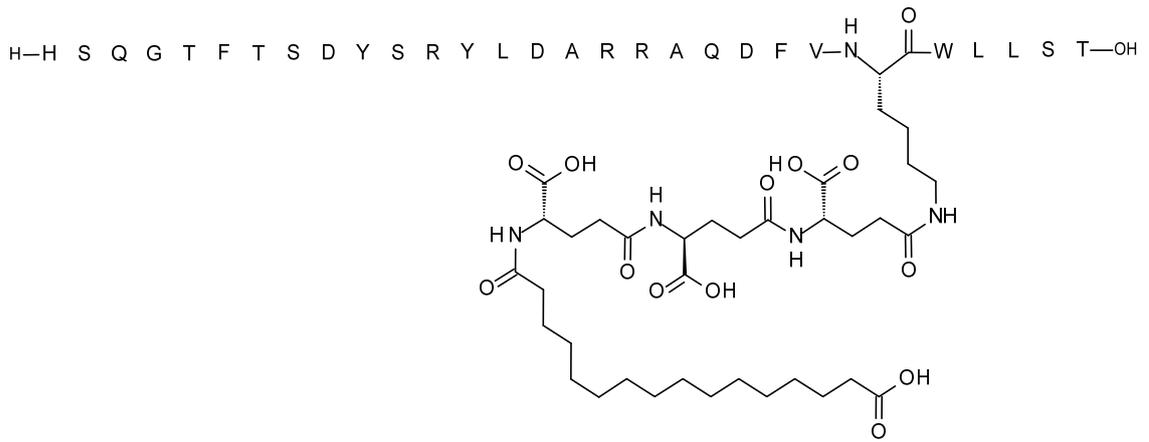
55



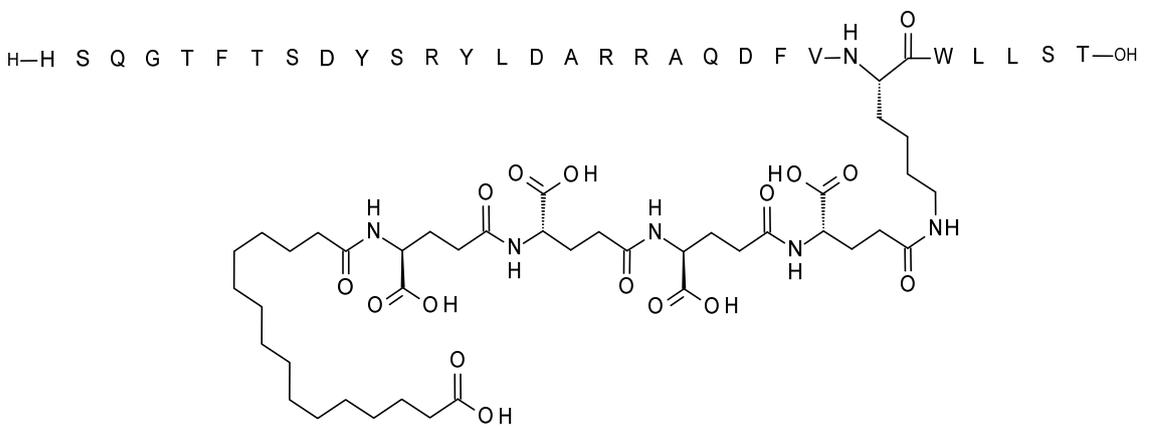
Sustancia química 72:

60

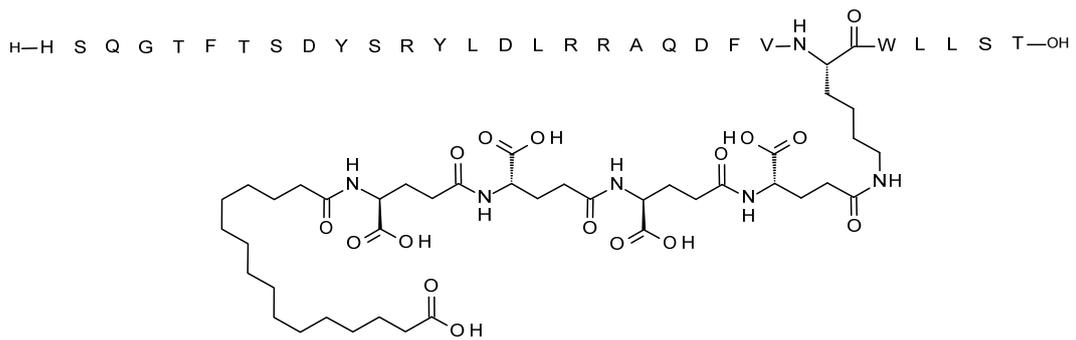
65



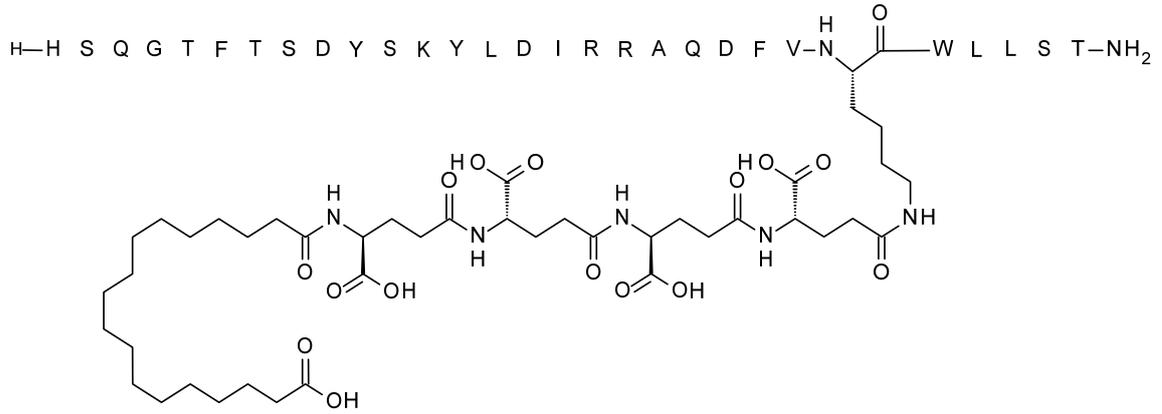
Sustancia química 73:



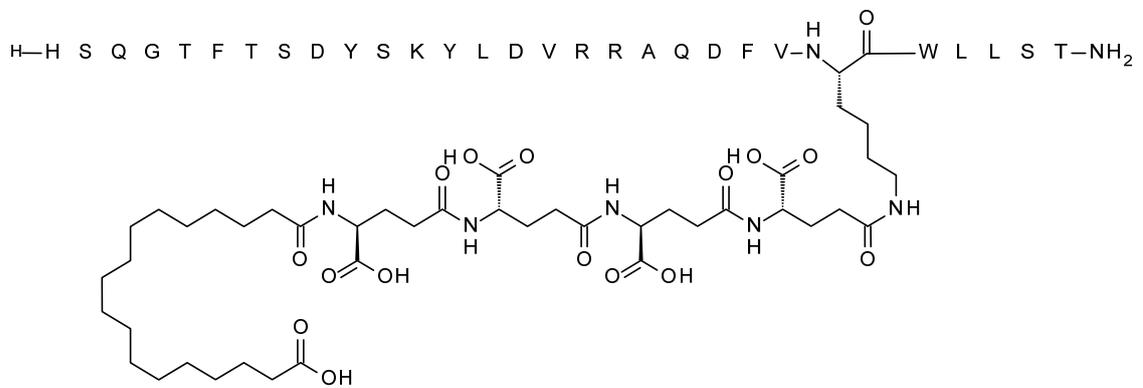
Sustancia química 74:



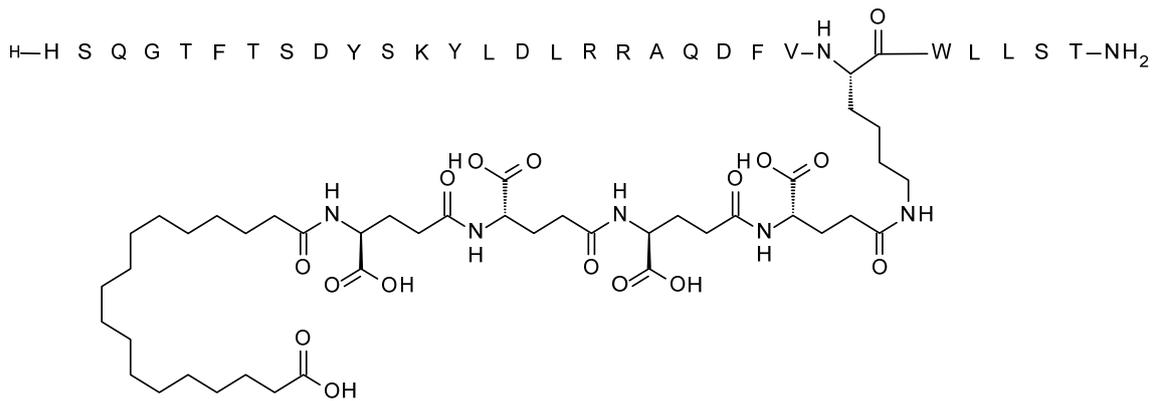
Sustancia química 75:



Sustancia química 76:



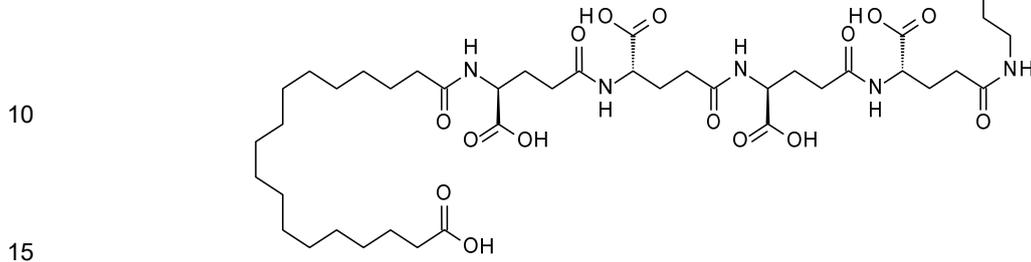
Sustancia química 77:



Sustancia química 78:



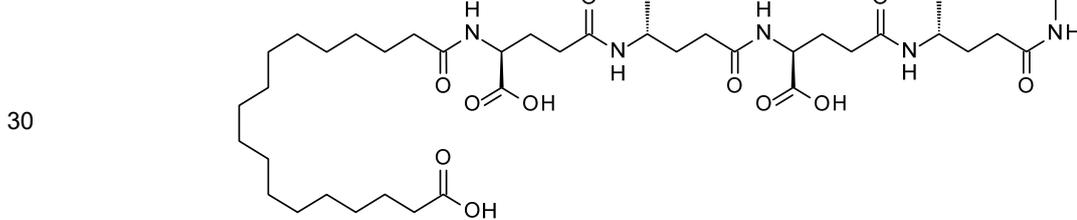
5



Sustancia química 79:



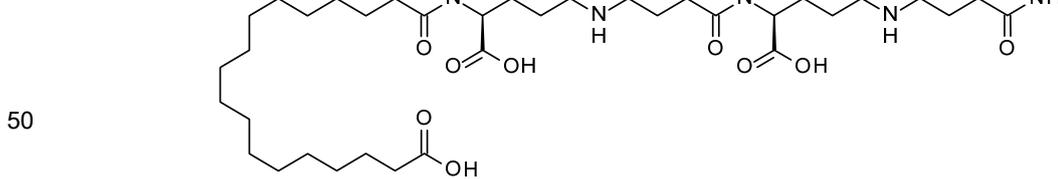
25



Sustancia química 80:



45

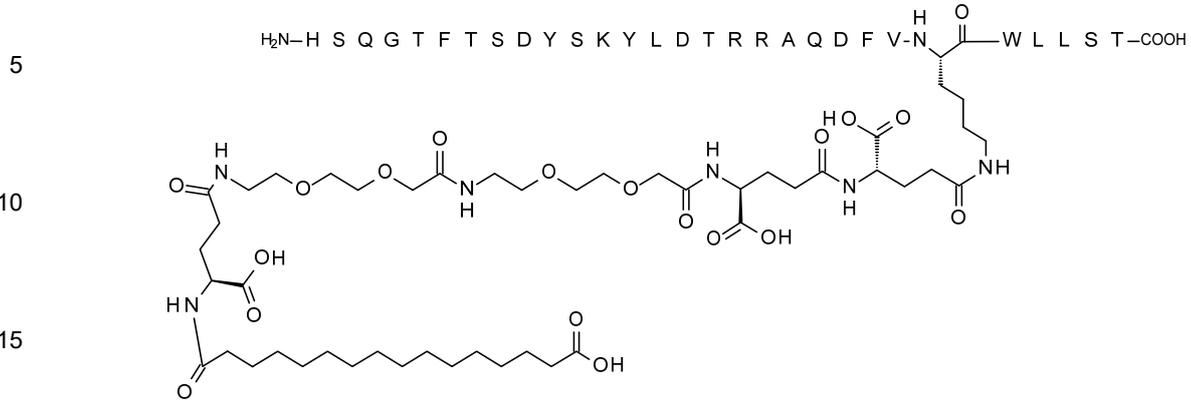


Sustancia química 81:

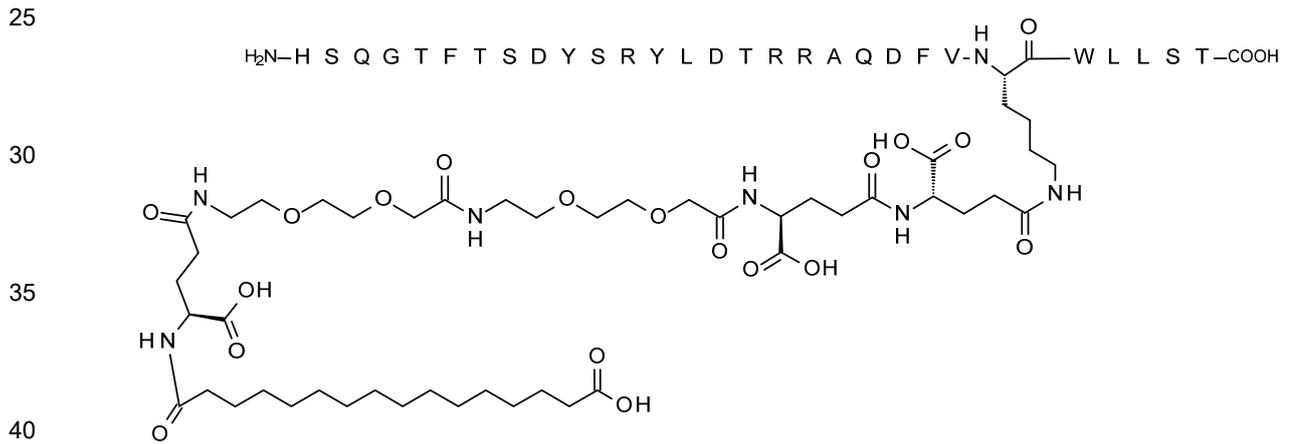
55

60

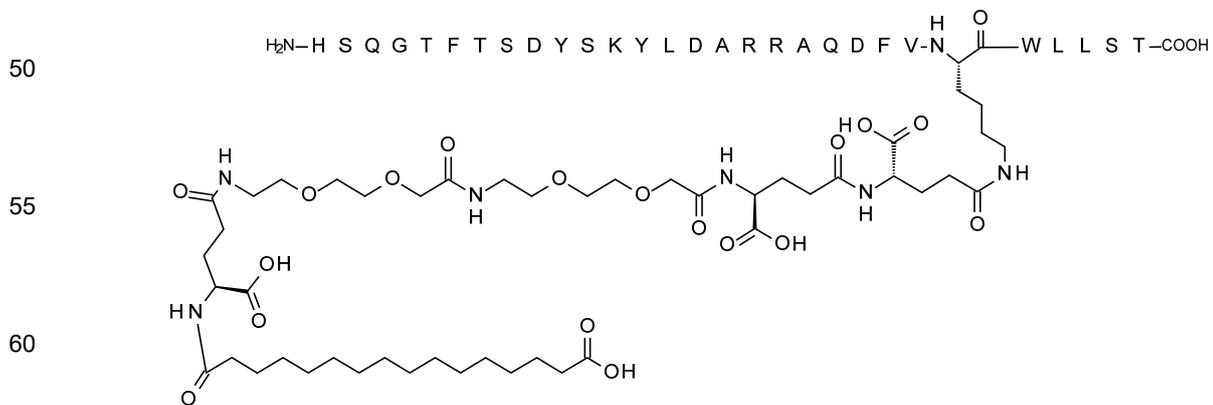
65



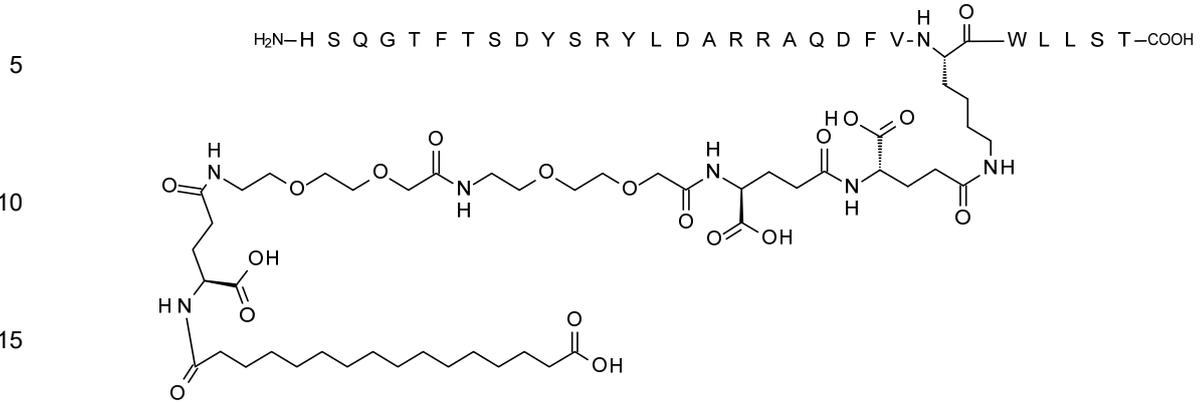
Sustancia química 82:



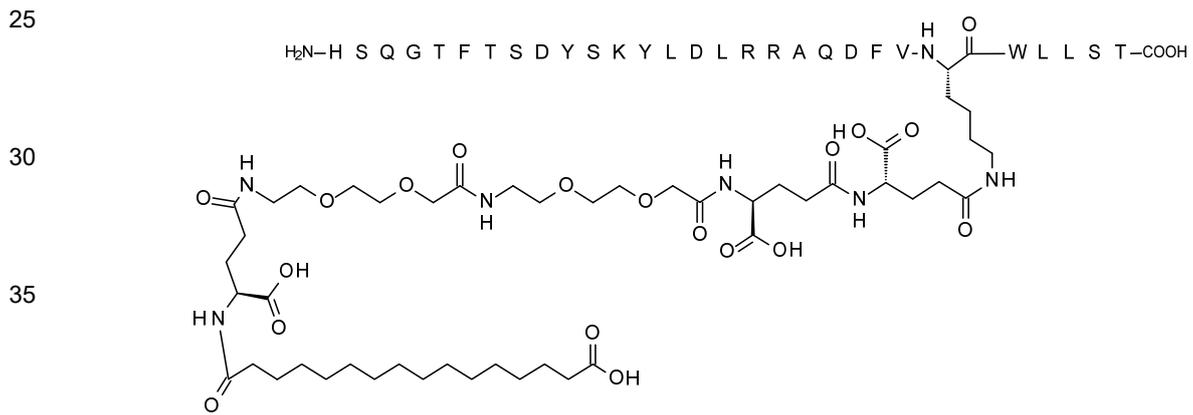
Sustancia química 83:



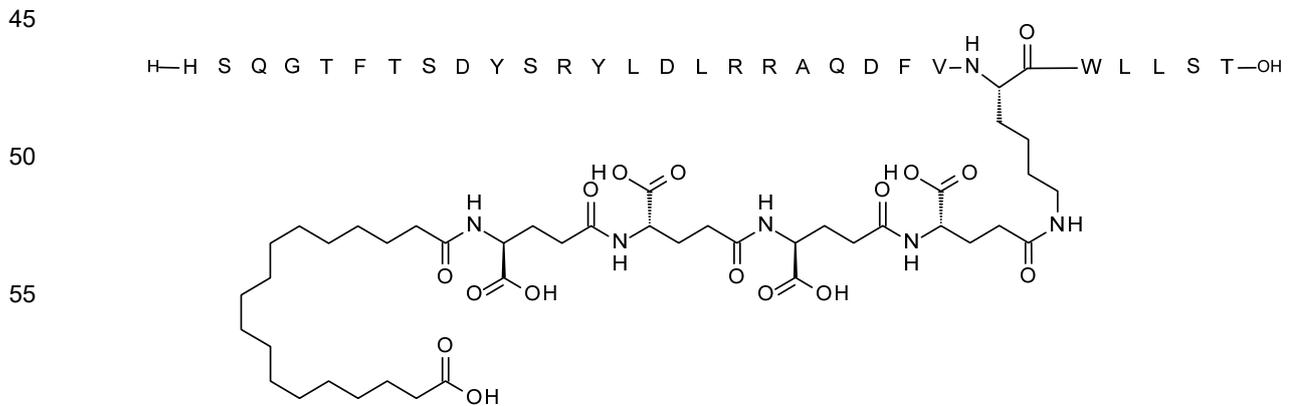
Sustancia química 84



Sustancia química 85:



Sustancia química 86:



Sustancia química 87:

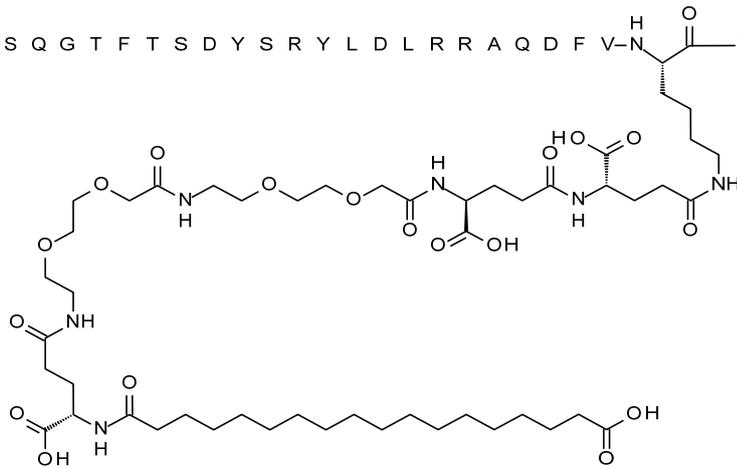
65



5

10

15



20 Sustancia química 88:

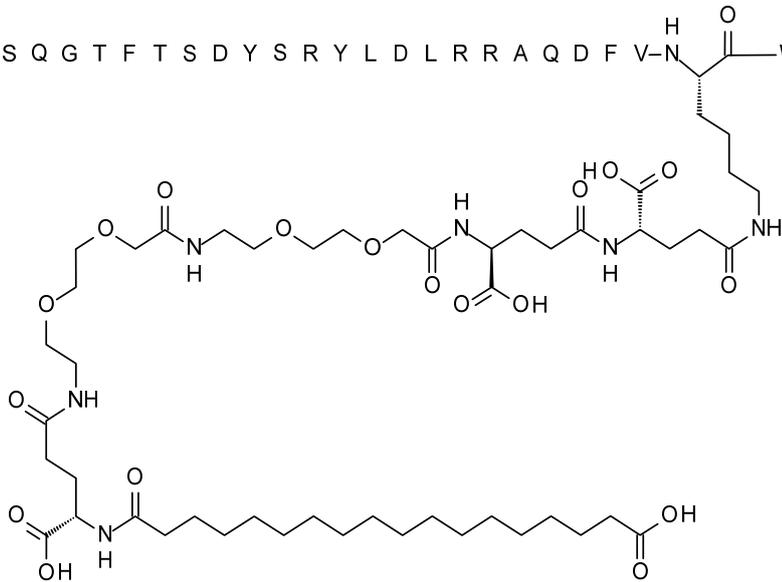


25

30

35

40



45 Sustancia química 89:

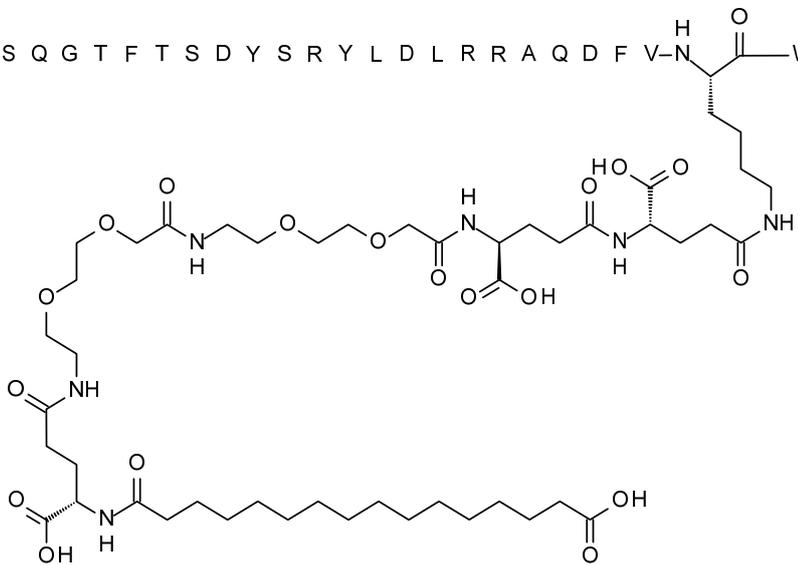


50

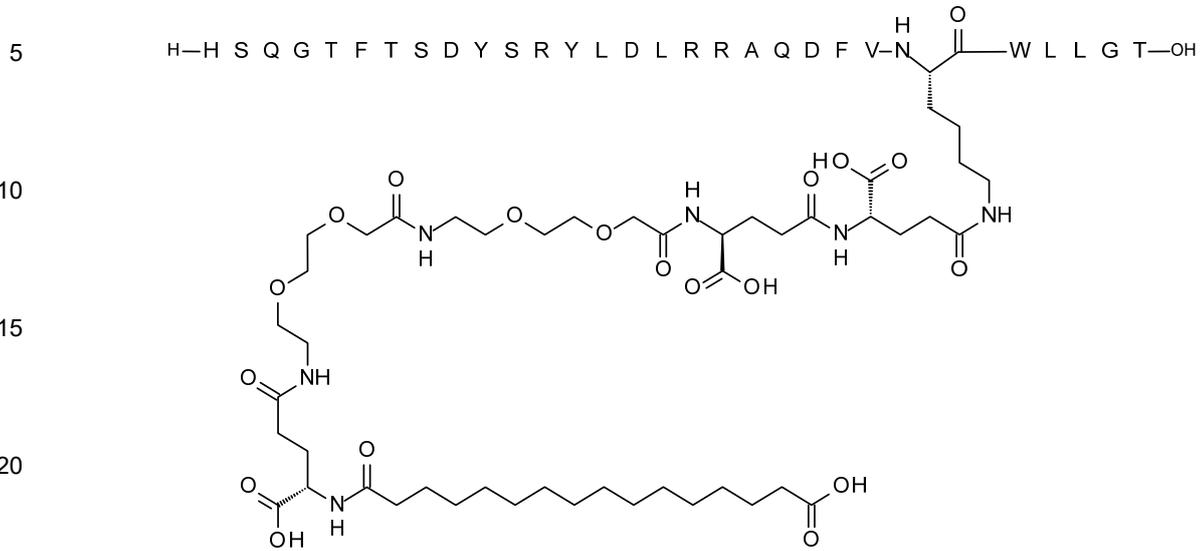
55

60

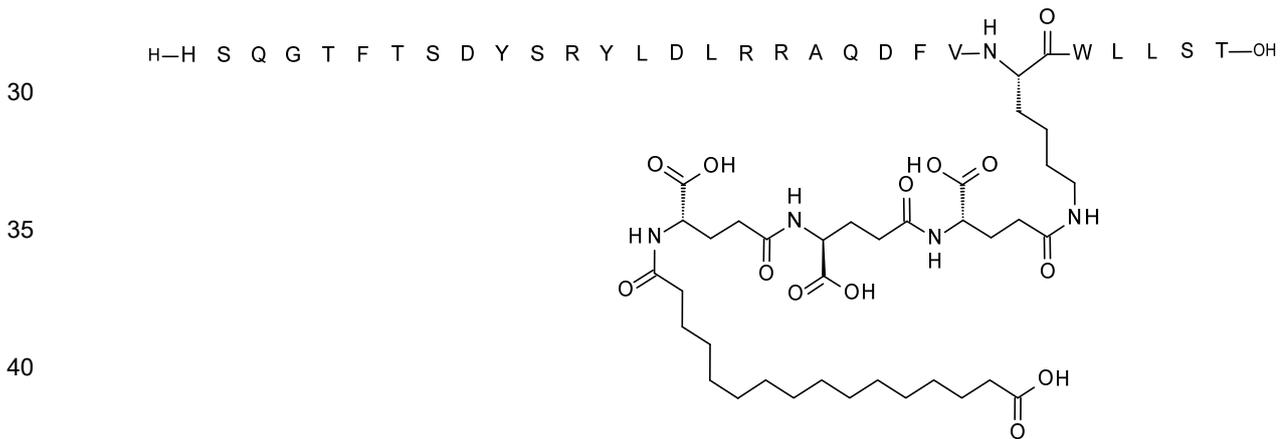
65



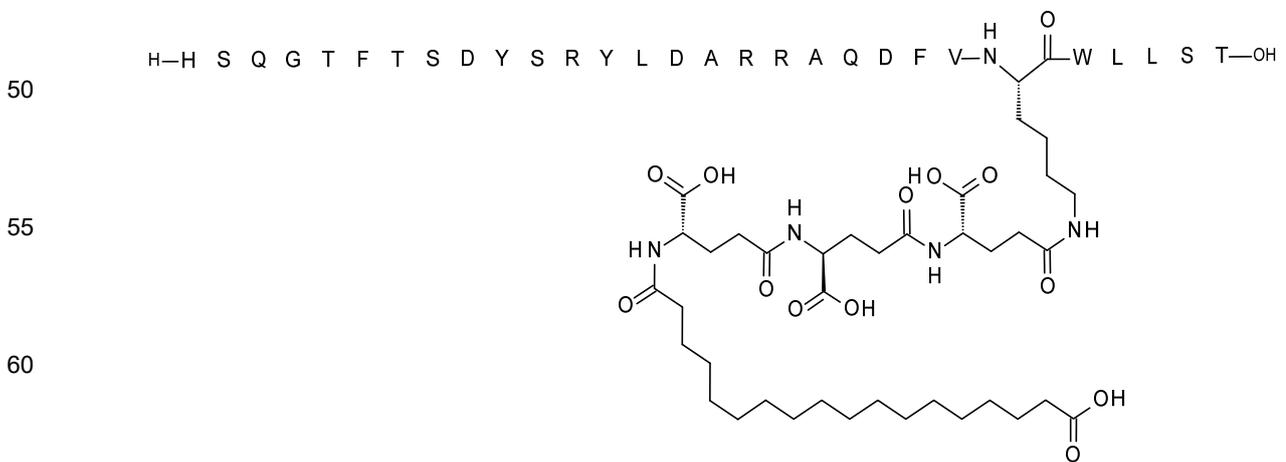
Sustancia química 90:



Sustancia química 91:



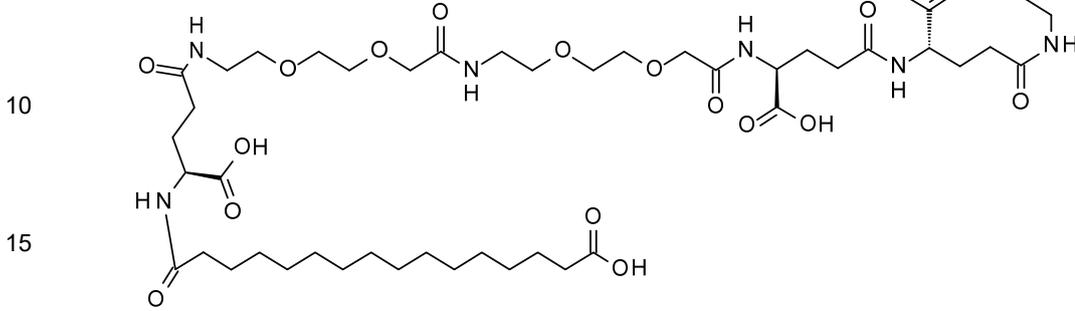
Sustancia química 92:



Sustancia química 93:



5

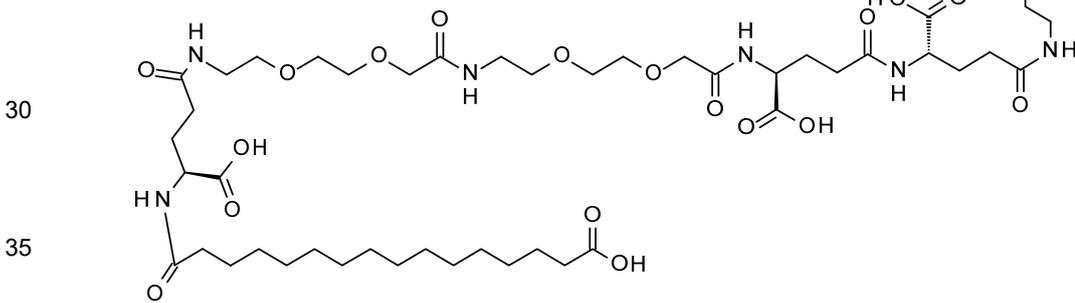


Sustancia química 94:

20



25

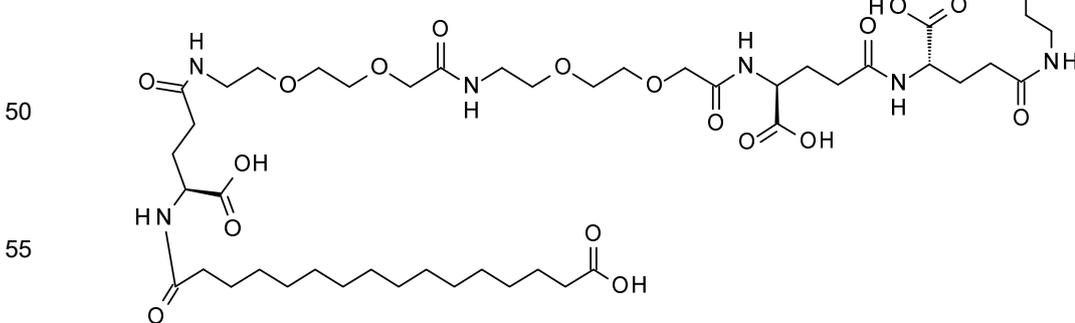


Sustancia química 95:

40



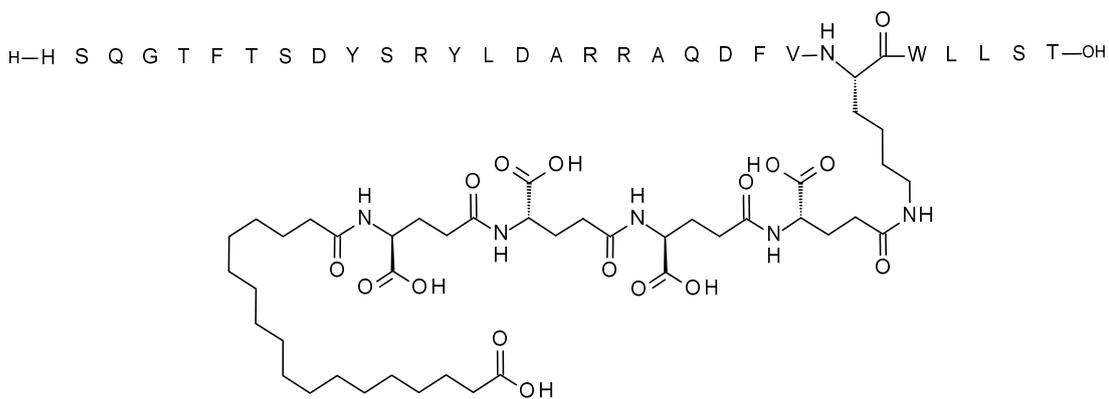
45



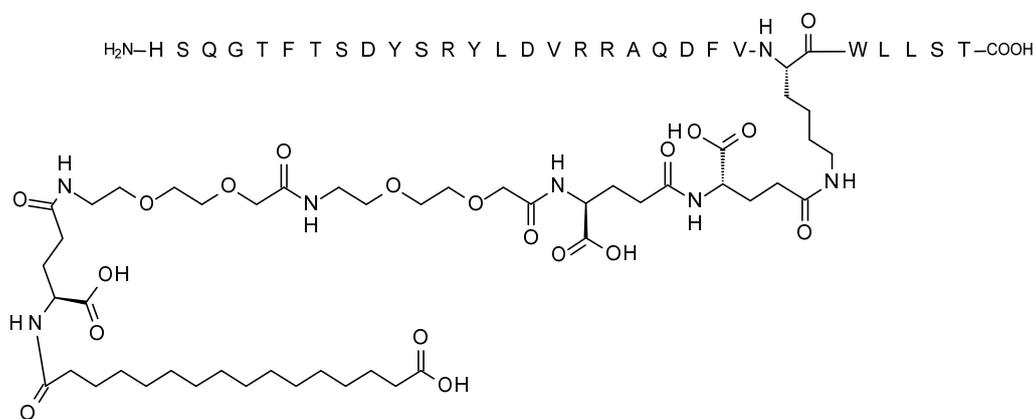
Sustancia química 96:

60

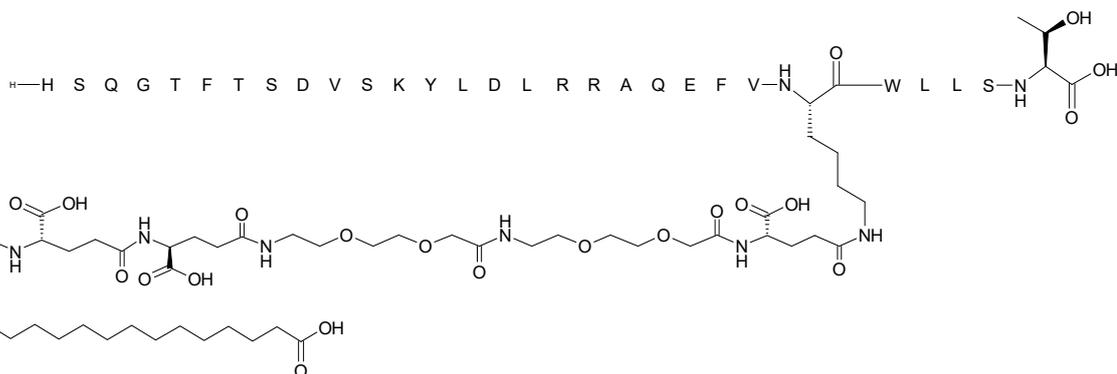
65



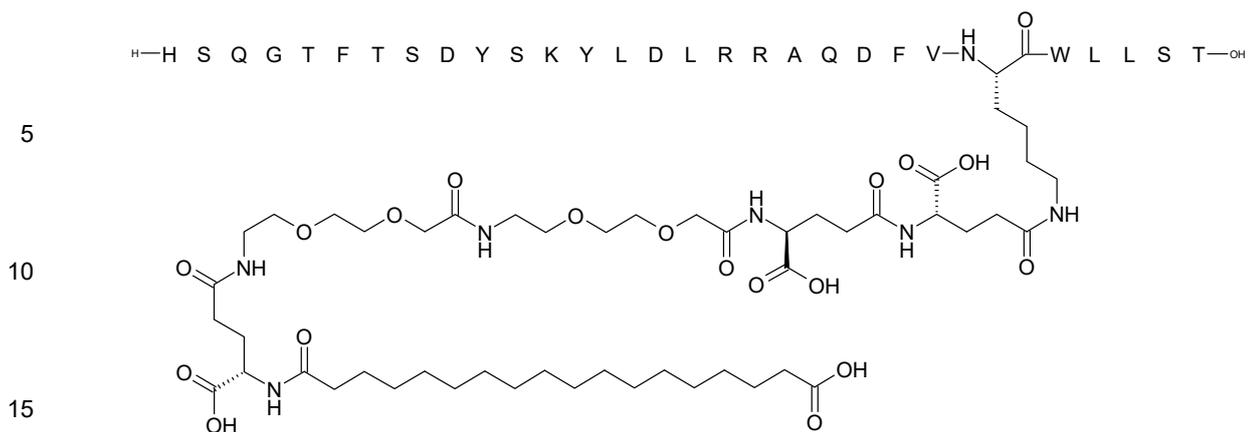
o Sustancia química 97:



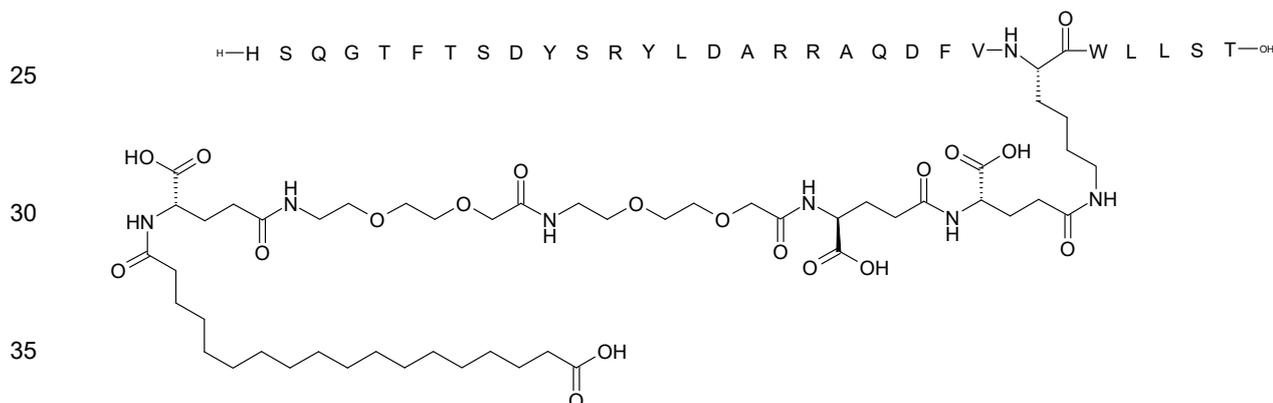
Modalidad 9: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención que tiene la estructura: N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Val¹⁰,Leu¹⁶,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón



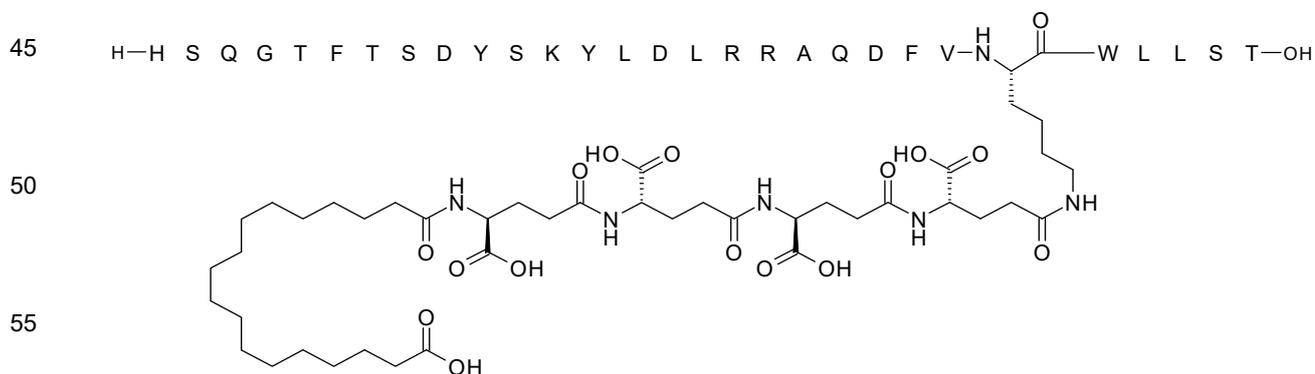
Modalidad 10: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención que tiene la estructura: N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón



Modalidad 11: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención que tiene la estructura: N^ε24-[(4S)-4-carboxi-4-
 20 [[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-
 [Arg¹²,Ala¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón



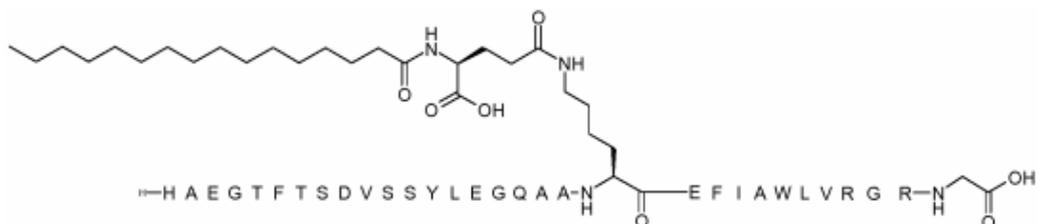
Modalidad 12: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención que tiene la estructura: N^ε24-[(4S)-4-carboxi-4-
 40 [[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-
 Glucagón



Modalidad 13: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde dicho péptido de glucagón está en
 60 combinación con un compuesto GLP-1, un compuesto insulínico o exendina-4.

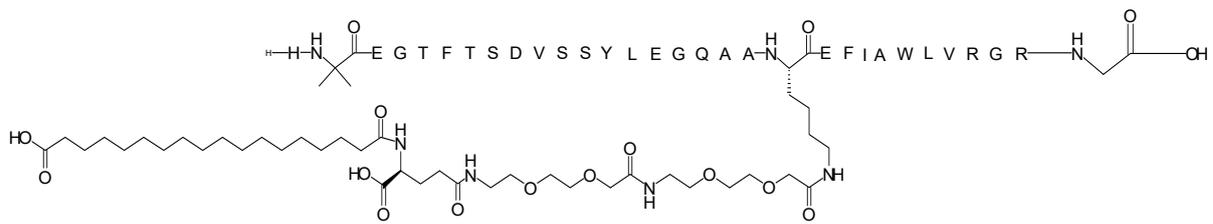
Modalidad 14: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde dicho compuesto de GLP-1 se selecciona
 del grupo que consiste en compuestos G1 y G3:

65 N-épsilon26-((S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butiril)[Arg34]GLP-1-(7-37):



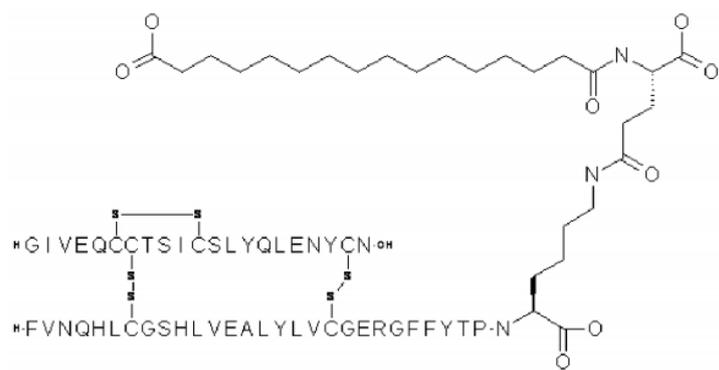
(compuesto G1);

N-épsilon26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37):



(compuesto G3).

Modalidad 15: El péptido de glucagón de acuerdo con la invención, en donde el compuesto insulínico es el compuesto G5: insulina humana NεB29-hexadecandioil-γ-Glu-(desB30)



(compuesto G5).

Modalidad 16: Una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón de acuerdo con la invención.

1. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además uno o más compuestos o sustancias activas terapéuticamente adicionales.

Modalidad 17: La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, que es adecuada para la administración parenteral.

Modalidad 18: Un péptido de glucagón de acuerdo con la invención, para usar en la terapia.

2.

Los inventores encontraron sorprendentemente que los compuestos de la presente invención tienen una solubilidad acuosa mejorada a pH neutro o pH ligeramente básico. Además, los análogos de glucagón en la presente descripción tienen una estabilidad mejorada hacia la formación de geles y fibrillas en soluciones acuosas. Los análogos de glucagón también tienen una estabilidad química sorprendentemente mejorada, es decir, se reduce la degradación química de los análogos. Los inventores han encontrado que los compuestos de la presente invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, es decir, tienen una vida media prolongada *in vivo*. Además, los compuestos tienen una reducción significativa en el peso corporal con la administración s.c.

La solubilidad de diferentes valores de pH puede medirse como se describe en el Ensayo IX.

La estabilidad física de los compuestos de la presente invención puede medirse mediante un método como se describe en el Ensayo II.

La estabilidad química de los análogos puede medirse como se describe en el Ensayo X.

La vida media puede determinarse en un estudio farmacocinético en especies tal como ratas (Ensayo VIII) o en cerdos (Ensayo XI). La reducción en el peso corporal puede medirse en ratones DIO como se describe en el Ensayo XII.

El efecto prolongado de los compuestos de la presente invención significa que se prolonga el período de tiempo en donde ejercen una actividad biológica.

Puede lograrse un mejor control de los niveles de glucosa en sangre en la diabetes tipo 1 y 2 mediante la coadministración de glucagón con agentes antidiabéticos conocidos tales como insulina, agonistas de GLP-1 y agonistas de GIP.

En una modalidad, los análogos de glucagón de esta invención pueden coformularse con análogos de GLP-1 o análogos de insulina, lo que forma composiciones farmacéuticas estables.

La combinación de la terapia con insulina y glucagón puede ser ventajosa en comparación con la terapia con solo insulina. Normalmente, en una situación posprandial cuando los niveles de glucosa en sangre bajan, la primera respuesta hormonal es la reducción en la producción de insulina. Cuando la glucosa en sangre baja aún más, la respuesta de segunda línea es la producción de glucagón, lo que resulta en un aumento de la producción de glucosa del hígado. Cuando los diabéticos reciben una dosis exógena de insulina que es demasiado alta, la respuesta natural del glucagón elevado se evita por la presencia de la insulina exógena, ya que la insulina tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de glucagón. En consecuencia, una ligera sobredosis de insulina puede causar hipoglucemia. En la actualidad, muchos pacientes diabéticos tienden a preferir usar un poco menos de insulina que la óptima por temor a episodios de hipoglucemia que pueden poner en peligro la vida.

Los compuestos de la presente invención son solubles a pH neutro, por lo tanto pueden permitir una coformulación con insulina y permitir niveles más estables de glucosa en sangre y una cantidad reducida de episodios hipoglucémicos, así como también un menor riesgo de complicaciones relacionadas con la diabetes.

3.

GLP-1 es una hormona incretina producida por las células endocrinas del intestino después de la ingestión de alimentos. GLP-1 es un regulador del metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina de las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. GLP-1 también causa la secreción de insulina en el estado diabético. Sin embargo, la vida media in vivo de GLP-1 es muy corta, por lo tanto, las formas de prolongar la vida media de GLP-1 in vivo han atraído mucha atención.

El documento WO 98/08871 describe análogos y derivados de GLP-1 basados en GLP-1(7-37) humano que tiene una vida media prolongada, que incluyen liraglutida, un derivado de GLP-1 para su administración una vez al día desarrollada por Novo Nordisk A/S. comercializado para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

Exenatida es un mimético comercial de incretina para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, fabricado y comercializado por Amylin Pharmaceuticals y Eli Lilly. & Co. La exenatida se basa en exendina-4, una hormona que se encuentra en la saliva del monstruo de Gila. Muestra propiedades biológicas similares al GLP-1 humano. El documento US 5424286 se refiere, entre otras cosas, a un método para estimular la liberación de insulina en un mamífero mediante la administración de exendina-4 (SEQ ID NO 3).

El término "compuesto de GLP-1", como se usa en la presente descripción, se refiere a GLP-1(7-37) humano, exendina-4, así como también a análogos, péptidos de fusión y derivados de los mismos, que mantienen la actividad de GLP-1.

Con respecto a la numeración de las posiciones en los compuestos de GLP-1: para los propósitos presentes cualquier sustitución, delección y/o adición de aminoácidos se indica con relación a las secuencias de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO 2) y/o exendina-4. Sin embargo, la numeración de los residuos de aminoácidos en el listado de secuencias siempre comienza con el núm. 1, mientras que para el presente propósito queremos, después de la práctica establecida en la técnica, comenzar con el residuo de aminoácido núm. 7 y asignarle el número 7 a este en el caso de GLP-1(7-37). Por lo tanto, generalmente, cualquier referencia en la presente descripción al número de posición de la secuencia de GLP-1(7-37) es a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y termina con Gly en la posición 37.

Los compuestos de GLP-1 pueden prepararse como se conoce en la técnica.

La actividad de GLP-1 puede determinarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, el ensayo (II) en la presente descripción (estimulación de la formación de AMPc en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano).

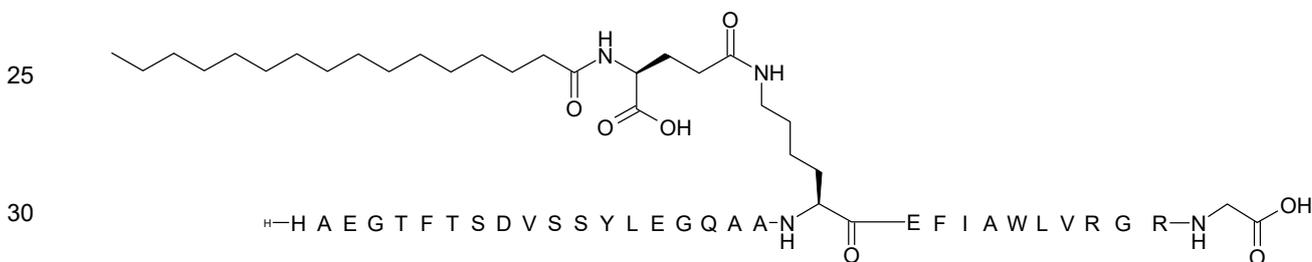
5 Además, el compuesto de GLP-1 es un compuesto que puede:

i) comprender al menos uno de los siguientes: DesaminoHis7, Aib8, Aib22, Arg26, Aib35, y/o Lys37;

10 ii) ser un derivado de GLP-1 que comprende un resto de unión a albúmina que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, con mayor preferencia dos, grupos de ácido carboxílico libres; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

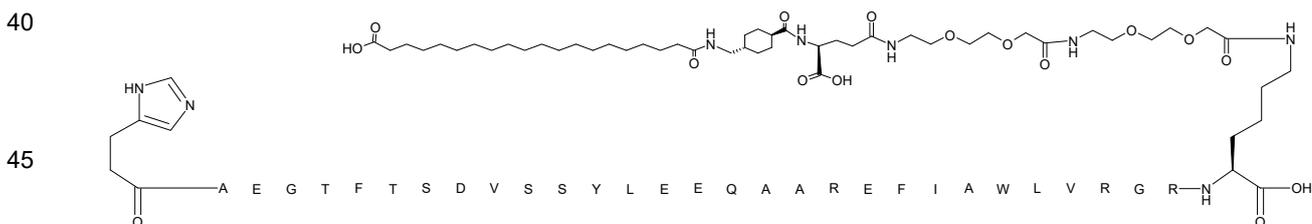
15 iii) ser un derivado de GLP-1 que comprende un resto de unión a albúmina que comprende un radical acilo de un ácido dicarboxílico, que comprende preferentemente un total de 12 a 24 átomos de carbono, tal como C12, C14, C16, C18, C20, C22 o C24, con la máxima preferencia C16, C18 o C20; en donde preferentemente a) el radical acilo se une al grupo amino épsilon de un residuo de lisina del péptido GLP-1 a través de un enlazador; b) el enlazador comprende al menos un radical OEG, y/o al menos un radical ácido 4-aminometil-ciclohexanocarboxílico, y, opcionalmente, adicionalmente al menos un Glu; y/o

20 iv) seleccionarse del grupo que consiste en los compuestos N-epsilon26-((S)-4-Carboxi-4-hexadecanoilamino-butiril) [Arg34]GLP-1-(7-37):



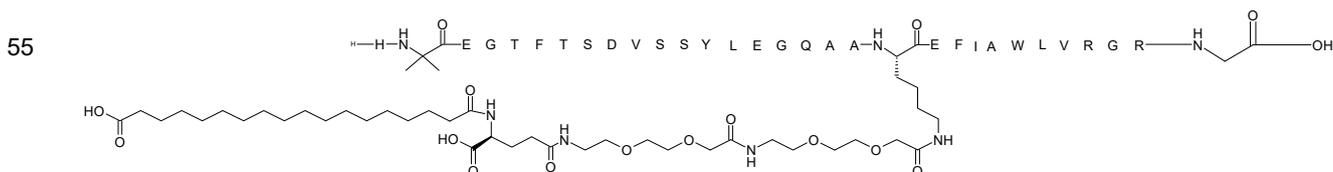
(compuesto G1);

35 N-epsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxinadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino]butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil)] [Des aminoHis7, Glu22, Arg26, Arg34, Lys37]GLP-1-(7-37):



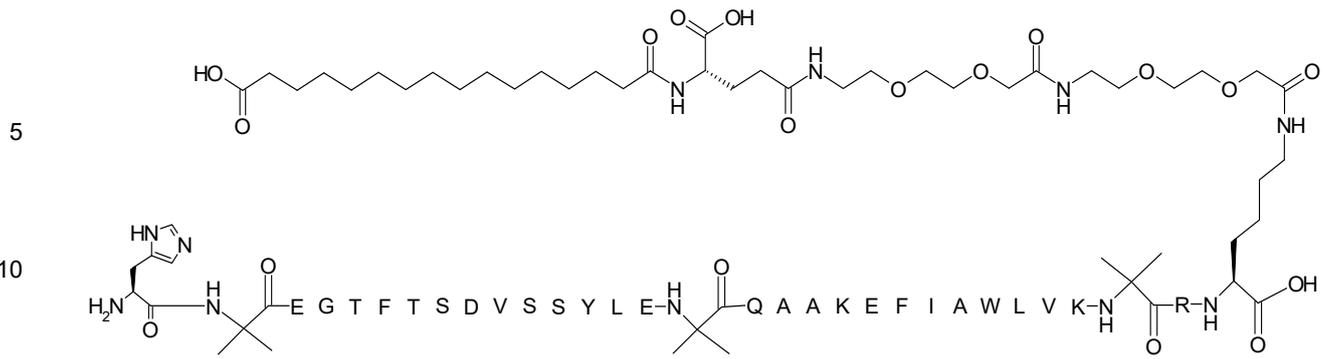
(compuesto G2);

50 N-epsilon26-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil)] [Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37):



(compuesto G3);

65 N-epsilon37-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-carboxi-4-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi]-etoxi)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-acetil]] [Aib8, 22, 35, Lys37]GLP-1-(7-37):



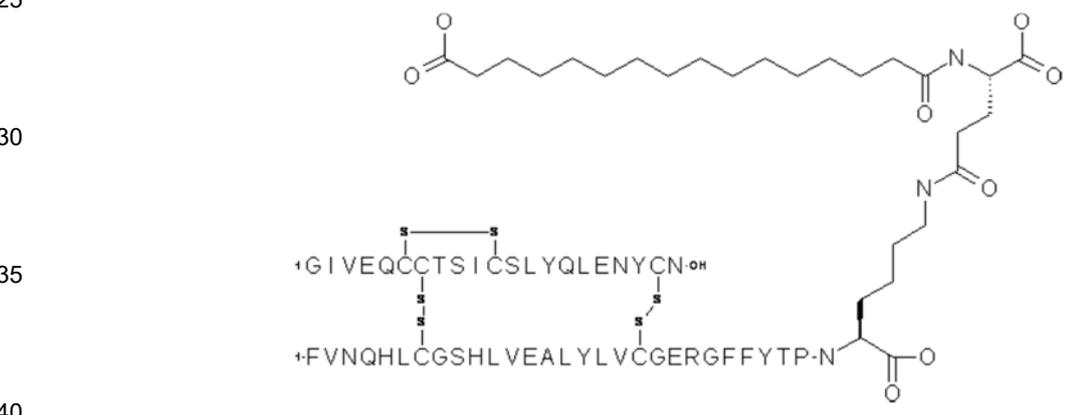
15 (compuesto G4);

y sus sales, amidas, alquilos o ésteres aceptables farmacéuticamente de estos.

20 En la presente descripción una "insulina" de acuerdo con la invención debe entenderse como insulina humana, un análogo de insulina o un derivado de insulina.

El compuesto insulínico es un compuesto que, por ejemplo, puede representarse por:

25 insulina humana NεB29-hexadecandioil-γ-Glu-(desB30)



(compuesto G5);

45 Los compuestos de la presente invención y agentes contra la obesidad o contra la diabetes como se define en la presente descripción, pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Los factores pueden suministrarse en forma de dosificación única en donde la forma de dosificación única contiene ambos compuestos, o en forma de un kit de partes que comprende una preparación del compuesto de la presente invención como una primera forma de dosificación unitaria y una preparación de los agentes contra la obesidad o contra la diabetes como una segunda forma de dosificación unitaria. Cuando se menciona una primera o segunda o tercera, etcétera, dosis unitaria a lo largo de esta descripción esto no indica el orden de administración preferido, sino que se hace simplemente por propósitos de

50 conveniencia.

Por administración de la dosis "simultánea" de una preparación de un compuesto de la presente invención y de una preparación de agentes contra la obesidad o contra la diabetes se entiende la administración de los compuestos en forma de dosificación única, o la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación temporal de no más de 15 minutos, preferentemente, 10, con mayor preferencia, 5, con mayor preferencia, 2 minutos. Cualquiera de los factores puede administrarse primero.

60 Por administración de la dosis "secuencial" se entiende la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación temporal de más de 15 minutos. Cualquiera de las dos formas de dosificación unitaria puede administrarse primero. Preferentemente, ambos productos se inyectan por medio del mismo acceso intravenoso.

Como ya se indicó, en todos los métodos o indicaciones terapéuticas descritas anteriormente, un compuesto de la presente invención puede administrarse solo. Sin embargo, también puede administrarse en combinación con uno o más agentes, sustancias o compuestos activos terapéuticamente adicionales, ya sea secuencialmente o de manera concomitante.

Una dosificación típica de un compuesto de la invención, cuando se emplea en un método de acuerdo con presente la invención, está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, con mayor preferencia, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día administrado en una o más dosis, tal como de 1 a 3 dosis. La dosis exacta dependerá de la frecuencia y el modo de administración, el sexo, la edad, el peso y el estado general del sujeto que se trata, la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata, cualesquiera enfermedades concomitantes a tratar y otros factores evidentes para los expertos en la técnica.

Los compuestos de la invención comprenden compuestos que se cree que son bien adecuados para la administración con intervalos más largos que, por ejemplo, una vez al día, por lo tanto, los compuestos formulados adecuadamente de la invención pueden ser adecuados para, por ejemplo, la administración dos veces por semana o una vez por semana mediante una vía de administración adecuada, tal como una de las vías descritas en la presente descripción.

Como se describió anteriormente, los compuestos de la presente invención pueden administrarse o aplicarse en combinación con uno o más compuestos o sustancias activas terapéuticamente adicionales, y pueden seleccionarse compuestos o sustancias adicionales adecuados, por ejemplo, de agentes contra la diabetes, agentes antihiperlipidémicos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y agentes para el tratamiento de complicaciones que resultan de, o asociadas con, la diabetes.

Los agentes antidiabéticos adecuados incluyen insulina, derivados o análogos de insulina, derivados o análogos de GLP-1 (péptido similar a glucagón-1) u otros análogos de GLP-1 tales como liraglutida (Victoza, Novo Nordisk A/S), exenatida (Byetta, Eli Lilly/Amilina), taspoglútilo (Roche), albiglutido (Syncria, GlaxoSmithKline), amilina, análogos de amilina (por ejemplo, Symlin/Pramlintida) así como también agentes hipoglucémicos activos por vía oral.

Los compuestos de la presente invención tienen una mayor selectividad del receptor de glucagón en relación con los péptidos descritos anteriormente en la técnica. Además, los péptidos de la presente invención tienen una vida media in vivo prolongada. Los compuestos de la presente invención puede ser un agonista soluble del receptor de glucagón, por ejemplo, con solubilidad de al menos 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, al menos 0,5 mmol/l, al menos 2 mmol/l, al menos 4 mmol/l, al menos 8 mmol/l, al menos 10 mmol/l, o al menos 15 mmol/l.

En el presente contexto, si no se indica de cualquier otra manera, los términos "soluble", "solubilidad", "soluble en solución acuosa", "solubilidad acuosa", "soluble en agua", "soluble en-agua", "solubilidad en agua" y "solubilidad en-agua", se refieren a la solubilidad de un compuesto en agua o en una sal acuosa o solución tampón acuosa, por ejemplo, una solución de fosfato 10 mM, o en una solución acuosa que contiene otros compuestos, pero no solventes orgánicos.

Los términos "polipéptido" y "péptido", como se usan en la presente descripción, significan un compuesto formado por al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético, así como también aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético son, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados mediante síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometil benzoico, y ácido antranílico.

El término "análogo", como se usa en la presente descripción con referencia a un polipéptido, significa un péptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos del péptido y/o en donde se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos del péptido o se han añadido uno o más residuos de aminoácidos al péptido. Dicha adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. Se usa un sistema simple para describir los análogos. Las fórmulas de análogos de péptidos y derivados de estos se dibujan mediante el uso de abreviaturas estándar de una sola letra o tres letras para aminoácidos usadas de acuerdo con la nomenclatura IUPAC-IUB.

El término "derivado", como se usa en la presente descripción en relación con un péptido, significa un péptido modificado químicamente o un análogo de este, en donde al menos un sustituyente no está presente en el péptido sin modificar o en un análogo de este, es decir, un péptido que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y similares.

Debe entenderse que todos los aminoácidos para los que no se indica el isómero óptico son el isómero L.

El término "péptido de glucagón", como se usa en la presente descripción, significa péptido de glucagón, compuesto de glucagón, compuesto de acuerdo con la presente invención, compuesto de la invención, compuesto de la fórmula I, un análogo de glucagón, un derivado de glucagón o un derivado de análogo de glucagón de glucagón humano, glucagón

humano(1-29), glucagón(1-30), glucagón(1-31), glucagón(1-32) así como también análogos, péptidos de fusión, y derivados de estos, que mantienen la actividad del glucagón.

Con respecto a la numeración de las posiciones en los compuestos de glucagón: para los propósitos presentes cualquier sustitución, delección y/o adición de aminoácidos se indica con relación a las secuencias del glucagón humano natural (1-29) (SEQ ID 1). Las posiciones de aminoácidos 1-29 del glucagón humano son en la presente descripción las mismas que las posiciones de aminoácidos X₁ a X₂₉. La secuencia (1-29) del glucagón humano es His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID 1).

Glucagón(1-30) significa glucagón humano con una extensión de un aminoácido en el C-terminal, glucagón(1-31) significa glucagón humano con una extensión de dos aminoácidos en el C-terminal y glucagón(1-32) significa glucagón humano con una extensión de tres aminoácidos en el C-terminal.

El término "distal", como se usa en la presente descripción, significa el más remoto (terminal) a partir del punto de unión.

El término "porción cargada negativo", como se usa en la presente descripción, significa una porción química que puede cargarse negativamente tal como, pero sin limitarse a, un ácido carboxílico, ácido sulfónico o una porción de tetrazol.

El término "porción lipófila", como se usa en la presente descripción, significa una porción de hidrocarburos alifáticos o cíclicos con más de 6 y menos de 30 átomos de carbono, en donde dicha porción de hidrocarburos puede contener sustituyentes adicionales.

El término "sustituyente", como se usa en la presente descripción, significa una porción química o grupo que reemplaza un hidrógeno.

El término "1H-tetrazol-5-ilo", como se usa en la presente descripción como una parte de los nombres químicos, pretende indicar ambos 1*H*-tetrazol-5-ilo y 2*H*-tetrazol-5-ilo.

4.

El término "protegido frente a la DPP-IV", como se usa en la presente descripción, por referencia a un polipéptido, significa un polipéptido que se ha modificado químicamente para hacer que dicho compuesto sea resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV). Se conoce que la enzima DPP-IV en plasma se implica en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ejemplo, glucagón, GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, etcétera. Por lo tanto, se hace un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos susceptibles a la hidrólisis mediada por DPP-IV para reducir la tasa de degradación por DPP-IV.

Además, los compuestos de la presente invención pueden estabilizarse contra la escisión de DPP-IV en un ensayo libre de albúmina como se describe en el Ensayo VII.

En el presente contexto, el término "agonista" pretende indicar una sustancia (ligando) que activa el tipo de receptor en cuestión.

En el presente contexto, el término "antagonista" pretende indicar una sustancia (ligando) que bloquea, neutraliza o contrarresta el efecto de un agonista.

El término "agonista de glucagón", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier péptido de glucagón que activa total o parcialmente el receptor de glucagón humano. En una modalidad preferida, el "agonista de glucagón" es cualquier péptido de glucagón que activa el receptor de glucagón, preferentemente con afinidad una potencia (EC₅₀) por debajo de 1 μM, por ejemplo, por debajo de 100 nM o por debajo de 1 nM, medido por el Ensayo I.

En el presente contexto, el término "sal aceptable farmacéuticamente" pretende indicar una sal que no es dañina para el paciente. Dichas sales incluyen sales por adición de ácidos aceptables farmacéuticamente, sales metálicas aceptables farmacéuticamente, sales de amonio y de amonio alquiladas. Las sales por adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos así como también de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodídrico, fosfórico, sulfúrico y nítrico, y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetileno salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico y similares. Otros ejemplos de sales por adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables mencionadas en J. Pharm. Sci. (1977) **66**, 2, que se incorpora en la presente descripción mediante referencia. Los ejemplos de sales metálicas relevantes incluyen sales de litio, sodio, potasio, y magnesio, y similares.

Los ejemplos de sales de amonio alquiladas incluyen sales de metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, y tetrametilamonio, y similares.

Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz terapéuticamente" de un compuesto se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar, o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad eficaz terapéuticamente". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como también del peso y estado general del sujeto. Debe entenderse que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse mediante el uso de la experimentación rutinaria, mediante la construcción de una matriz de valores y la evaluación de diferentes puntos en la matriz, todo lo cual está dentro del nivel de experticia de un médico o veterinario entrenado.

Los términos "tratamiento", "tratar" y otras variantes de estos, como se usan en la presente descripción, se refieren al manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. Los términos pretenden incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada de la que padece el paciente, tal como la administración del(de los) compuesto(s) activo(s) en cuestión para aliviar los síntomas o complicaciones de esta, para retardar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, y/o para prevenir la afección, en donde prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración del(de los) compuesto(s) activo(s) en cuestión para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones. El paciente a tratar es, preferentemente, un mamífero, en particular un ser humano, pero el tratamiento de otros animales, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cabras o cerdos, está dentro del alcance de la invención.

El término "residuo de unión a albúmina", como se usa en la presente descripción, significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina sérica humana. El residuo de unión a albúmina unido al polipéptido terapéutico tiene típicamente una afinidad inferior a 10 μM para la albúmina sérica humana y, preferentemente, inferior a 1 μM . Se conoce una gama de residuos de unión a albúmina entre las porciones lipófilas lineales y ramificadas que contienen de 4-40 átomos de carbono.

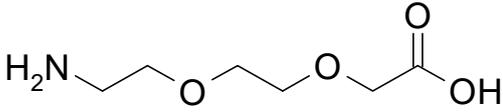
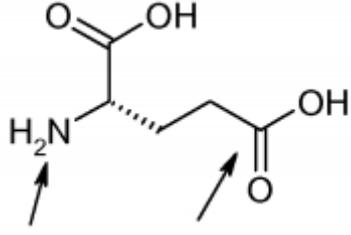
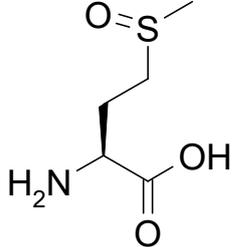
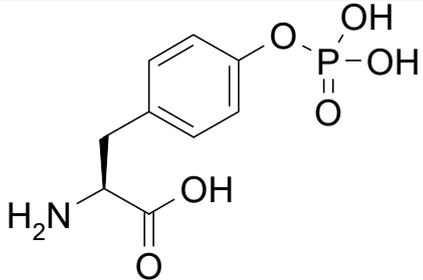
La selectividad entre el GLP-1 y el receptor de glucagón puede medirse como la relación entre los valores de EC_{50} o los valores de IC_{50} en los dos receptores. Los Ensayos (I) y (III) pueden usarse para medir la actividad en los receptores de glucagón y GLP-1, respectivamente.

En el caso de la administración de un péptido de glucagón de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más compuestos o sustancias activas terapéuticamente adicionales como se describen anteriormente, para un propósito relacionado con el tratamiento o prevención de la obesidad o sobrepeso, es decir, relacionado con la reducción o la prevención del exceso de adiposidad, puede ser relevante emplear dicha administración en combinación con la intervención quirúrgica para el propósito de lograr la pérdida de peso o prevenir la ganancia de peso, por ejemplo, en combinación con la intervención quirúrgica bariátrica. Los ejemplos de técnicas quirúrgicas bariátricas usadas frecuentemente incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: gastroplastia vertical con bandas (también conocida como "grapado de estómago"), en donde una parte del estómago se grapa para crear una bolsa preestomacal más pequeña que sirve como un nuevo estómago; bandas gástricas, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de banda gástrica ajustable (tal como la *Banda Gástrica Ajustable Sueca* (SAGB), el *LAP-BAND™* o el *MIDBanda™*), en donde se crea una pequeña bolsa preestomacal que sirve como un nuevo estómago mediante el uso de una banda elástica (por ejemplo, silicona) que puede ajustarse en tamaño por el paciente; y la cirugía de derivación gástrica, por ejemplo, derivación "en Y de Roux", en donde se crea una pequeña bolsa de estómago mediante el uso de un dispositivo grapador y se conecta al intestino delgado distal, donde la parte superior del intestino delgado se une nuevamente en una configuración en forma de Y.

La administración de un péptido de glucagón de la invención (opcionalmente en combinación con uno o más compuestos o sustancias activas terapéuticamente adicionales como se describió anteriormente) puede tener lugar durante un período antes de llevar a cabo la intervención quirúrgica bariátrica en cuestión y/o durante un período de tiempo posterior a esta. En muchos casos, puede preferirse comenzar la administración de un compuesto de la invención después que ha tenido lugar la intervención quirúrgica bariátrica.

El término "obesidad" implica un exceso de tejido adiposo. Cuando el consumo de energía supera el gasto de energía, el exceso de calorías se almacena en el tejido adiposo, y si este equilibrio positivo neto se prolonga, produce obesidad, es decir, existen dos componentes en el balance de peso, y una anomalía en uno de los lados (consumo o gasto) puede conducir a la obesidad. En este contexto, la obesidad se ve mejor como cualquier grado de exceso de tejido adiposo que imparte un riesgo de salud. La distinción entre individuos normales y obesos solo puede aproximarse, pero el riesgo de salud impartido por la obesidad es probablemente una continuidad del aumento del tejido adiposo. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los individuos con un índice de masa corporal (BMI = peso corporal en kilogramos dividido entre el cuadrado de la altura en metros) por encima de 25 deben considerarse obesos.

Las abreviaturas de aminoácidos usadas en el presente contexto tienen los significados siguientes:

5	Ado	
	Aib	Ácido 2-aminoisobutírico
	Ala	Alanina
	Asn	Asparagina
10	Asp	Ácido aspártico
	Arg	Arginina
	Cit	Citrulina
	Cys	Cisteína
	Gln	Glutamina
15	Glu	Ácido glutámico
	γ-Glu	
20		grupo α-nitrógeno y γ-carboxi forman los enlaces amidas con los dos residuos vecinos
25	Gly	Glicina
	His	Histidina
	Hyp	4-hidroxiprolina
	Ile	Isoleucina
30	Leu	Leucina
	Lys	Lisina
	Met	Metionina
35	Met(O)	
40		
	Orn	Ornitina
	Phe	Fenilalanina
45	Pro	Prolina
	Ser	Serina
	Thr	Treonina
	Tyr	Tirosina
50	p(Tyr)	
55		
60	Trp	Triptófano
	Val	Valina

Las abreviaturas de aminoácidos que comienzan con D- seguido de un código de tres letras, tal como D-Ser, D-His, etcétera, se refieren al enantiómero D del aminoácido correspondiente, por ejemplo, D-serina, D-histidina, etcétera.

Composiciones farmacéuticas

- 5 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede realizarse a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o su combinación, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.
- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y las mucosas, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.
- 15 La formulación farmacéutica puede comprender un péptido de glucagón en una concentración de [0,01] mg/ml a [50] mg/ml. La formulación puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En una modalidad de la invención la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una modalidad adicional de la invención la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % peso/peso de agua.
- 20 Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.
- 25 En otra modalidad la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por atomización) lista para usar sin ninguna disolución previa.
- 30 El tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en acetato, carbonato, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, fosfato, fosfato de hidrógeno y tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS), bicina, tricina, succinato, ácido aspártico, asparagina o sus mezclas.
- 35 En una modalidad adicional de la invención, la formulación comprende, además, un conservante aceptable farmacéuticamente. En una modalidad adicional de la invención, el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, alcohol bencílico, clorobutanol, clorocresol, cloruro de bencetonio o sus mezclas. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.
- 40 En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende, además, un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar tal como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano o alcohol de azúcar tal como, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2 -propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o sus mezclas. El azúcar de alcohol incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól.
- 45 El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.
- 50 En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende, además, un agente quelante. En una modalidad adicional de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, EGTA y sus mezclas.
- 55 En una modalidad de la invención adicional la formulación comprende, además, un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.
- 60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, además, una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido o proteína durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Los aminoácidos pueden ser arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, etionina y buthionina y S-metil-L cisteína.
- 65 En una modalidad adicional de la invención puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a metionina sulfóxido cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina en el tiempo. La

- inhibición de la oxidación de metionina resulta en una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o sus combinaciones. La cantidad que debe añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de metionina sulfóxido sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de metionina sulfóxido. Generalmente, esto puede alcanzarse mediante la adición de metionina de manera que la relación entre la metionina añadida y los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.
- En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende, además, un estabilizante seleccionado del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una modalidad adicional de la invención el estabilizante se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o sus derivados (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio).
- En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende, además, un tensioactivo. Los tensioactivos típicos (con ejemplos de nombres comerciales entre corchetes[]) son ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno tales como monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20) [Tween 20], monopalmitato de sorbitán de polioxietileno (20) [Tween 40] o monooleato de sorbitán de polioxietileno (20) [Tween 80], poloxámeros tales como copolímero de bloques de polioxipropileno-polioxietileno [Pluronic F68/poloxámero 188], polietilenglicol octilfenil éter [Tritón X-100] o polioxietilenglicol dodecil éter [Brij 35]. El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.
- En una modalidad adicional de la invención la formulación comprende, además, inhibidores de proteasa tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y benzamidina HCl, pero pueden usarse, además, otros inhibidores de proteasa disponibles comercialmente. El uso de un inhibidor de proteasa es útil particularmente en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas o una enzima activada tal como FVIIa para inhibir la autocatálisis.
- Es posible que puedan presentarse otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Estos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).
- Las composiciones de la invención pueden adicionalmente, combinarse, o unirse, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, con un portador farmacéutico, sistema de administración de fármacos y sistema avanzado de administración de fármacos para mejorar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar la conformidad del paciente o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, pero no se limitan a polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(vinil alcohol), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de estos, polietilenglicoles, proteínas portadoras por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas copoliméricos en bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, micropartículas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de estos, fase L2 y dispersiones de esta, bien conocidas por los expertos en la técnica de comportamiento de fase en sistemas de lípidos y agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de estos, y dendrímeros.
- La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una lapicera. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del péptido de glucagón en la forma de un atomizador nasal o pulmonar. Como aún otra opción, las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de glucagón de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, *por ejemplo*, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, *por ejemplo*, bucal.
- Las formulaciones farmacéuticas para la aplicación oral de proteínas y polipéptidos terapéuticos pueden incluir la encapsulación del compuesto activo en nanopartículas, micropartículas u otros tipos de formas de dosificación multiparticuladas. Una opción adicional es el uso de potenciadores de la permeación tales como compuestos tensioactivos, péptidos penetrantes de células, sistemas de suministro de fármacos mucoadhesivos, agentes quelantes y otros. Otra opción adicional puede ser la adición de inhibidores de proteasas. Otra opción es el uso de sistemas de suministro de fármacos basados en lípidos como SEDDS, SMEDDS SNEDDS (sistemas de suministro de fármacos Autoemulsionantes, Automicroemulsionantes o Autonanoemulsionantes). Los sistemas de suministro de fármacos mencionados anteriormente pueden formularse en un comprimido o rellenarse en una cápsula dura o blanda

adecuada que puede recubrirse para liberar el compuesto activo de manera controlada o en un segmento intestinal preferido.

Ejemplos

5

Lista de abreviaturas

BOC:	terc-butiloxicarbonilo
DCM:	Diclorometano
DIC:	Diisopropilcarbodiimida
10 Fmoc:	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
LCMS:	Cromatografía líquida Espectrometría de masas
MeCN:	Acetonitrilo
15 Mtt:	4-Metiltrilito
NMP:	N-metil pirrolidona
Oxima Pura:	Éster etílico del ácido ciano-hidroxiimino-acético
RP:	Fase inversa
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
20 RT:	Temperatura ambiente
Rt:	Tiempo de retención
SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
TFA:	Ácido trifluoroacético
TIPS:	Triisopropilsilano
25 UPLC:	Cromatografía líquida de ultraeficacia

Métodos generales

30 Esta sección se refiere a métodos para la síntesis de péptidos unidos a resinas (métodos SPPS, lo que incluye métodos para la desprotección de aminoácidos, métodos para escindir el péptido de la resina y para su purificación), así como también métodos para detectar y caracterizar el péptido resultante (Métodos de LCMS y UPLC).

Métodos generales de SPPS

35 Los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc usados fueron el estándar recomendado: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Lys(Mtt)-OH suministrados por, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o NovabioChem.

40

Las SPPS se realizaron mediante el uso de química basada en Fmoc en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 EE.UU.). Una resina adecuada para la preparación de ácidos carboxílicos C-terminales es una resina Wang precargada y de baja carga disponible de NovabioChem (por ejemplo, resina fmoc-Thr(tBu)-Wang de baja carga, LL, 0,27 mmol/g). El grupo alfa amino N-terminal se protegió con Boc.

45

La desprotección de Fmoc se logró con piperidina al 20 % en NMP durante 2 x 3 min. La química de acoplamiento era DIC/HOAt/colidina o DIC/Oxima Pura/colidina. Las soluciones de aminoácido/HOAt o aminoácido/Oxima Pura (0,3 M/0,3 M en NMP a un exceso molar de 3-10 veces) se añadieron a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) seguido por colidina (3 M en NMP). Por ejemplo, se usaron las cantidades siguientes de solución de aminoácido/HOAt 0,3 M por acoplamiento para las siguientes reacciones en escala: Escala/ml, 0,05 mmol/1,5 ml, 0,10 mmol/3,0 ml, 0,25 mmol/7,5 ml. El tiempo de acoplamiento fue 2 x 30 min o 1 x 240 min.

50

El grupo Mtt se eliminó mediante el lavado de la resina con HFIP/DCM (75:25) (2 x 2 min), se lavó con DCM y se suspendió la resina en HFIP/DCM (75:25) (2 x 20 min) y se lavó posteriormente en secuencia con Piperidina/NMP (20:80), DCM(1x), NMP(1x), DCM(1x), NMP(1x).

55

La introducción de un sustituyente en el ε-nitrógeno de una Lisina se logró mediante el uso de una Lisina protegida con Mtt (Fmoc-Lys(Mtt)-OH). Del mismo modo, cuando la cadena lateral se presentó en una cadena lateral de ornitina, el grupo amino delta de la ornitina a acilar se protegió con Mtt (por ejemplo, Fmoc-Orn(Mtt)-OH). Alternativamente, el ε-nitrógeno de una lisina podría protegerse con un grupo ivDde (Fmoc-Lys(ivDde)-OH). El grupo amino delta de una ornitina igualmente podría protegerse con un grupo ivDde (Fmoc-Orn(ivDde)-OH). La incorporación de porciones gamma-Glu en la cadena lateral se logró mediante el acoplamiento con el aminoácido Fmoc-Glu-OtBu.

60

La introducción de cada porción en la cadena lateral se logró mediante el uso de un tiempo de acoplamiento prolongado (1 x 6 horas) seguido de taponado con anhídrido acético o alternativamente ácido

65

acético/DIC/HOAt/colidina. La acetilación del nitrógeno terminal en el sustituyente se logró mediante el uso de anhídrido acético (10 eq.) y colidina (20 eq.) en NMP.

Unión del sustituyente

5 El resto de unión a albúmina puede introducirse en un procedimiento por etapas mediante el sintetizador de péptidos Prelude como se describió anteriormente mediante el uso de bloques de construcción adecuadamente protegidos, con la modificación de que los aminoácidos y derivados de ácidos grasos que incluyen Fmoc-Ado-OH, Fmoc-Glu-OtBu y el éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico (o los ésteres de mono-terc-butilo diácidos análogos C8, C10, C12-, C14- C16-, C20-) se acoplaron durante 6 horas en cada etapa. Después de cada etapa de acoplamiento, el intermediario peptídico sin reaccionar se taponó mediante el uso de anhídrido acético y exceso de colidina (> 10 eq.). Los compuestos que contienen un resto 4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoilo se preparan de manera similar mediante el uso del bloque de construcción ácido 4-(N-(16-(tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoil)butírico (disponible mediante el procedimiento sintético descrito en el documento núm. WO 2007/009894).

Escisión de la resina

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

Purificación y cuantificación

25 El péptido crudo se disuelve en una mezcla adecuada de agua y MeCN tal como agua/MeCN (4:1) y se purifica mediante HPLC preparativa de fase inversa (Waters Deltaprep 4000 o Gilson) en una columna que contiene gel de sílice C18. La elución se realiza con un gradiente creciente de MeCN en agua que contiene TFA al 0,1 %. Las fracciones relevantes se revisan mediante HPLC analítica o UPLC. Las fracciones que contienen el péptido objetivo puro se mezclan y se concentran a presión reducida. La solución resultante se analiza (HPLC, LCMS) y el producto se cuantificó mediante el uso de un detector de quimioluminiscencia específico para nitrógeno de HPLC (Antek 8060 HPLC-CLND) o mediante la medición de la absorción UV a 280 nm. El producto se dispensa en viales de vidrio. Los viales se taponan con prefiltros de fibra de vidrio Millipore. La liofilización proporciona el trifluoroacetato peptídico como un sólido blanco.

Métodos para la detección y caracterización

Métodos de LCMS

Método: LCMS_2

40 Se usó un espectrómetro de masas API 3000 de Perkin Elmer Sciex para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC de Perkin Elmer Series 200. Eluyentes: A: Ácido trifluoro acético al 0,05 % en agua; B: Ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo. Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm. Gradiente: 5 % - 90 % de B durante 7,5 min a 1,5ml/min.

Método: LCMS_4

LCMS_4 se realizó en una configuración que consistió en un sistema UPLC Acquity de Waters y espectrómetro de masas LCT Premier XE de Micromass. Eluyentes: A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. El análisis se realizó a RT mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente, 2-10 µl) en la columna que se eluyó con un gradiente de A y B. Las condiciones de UPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas fueron: Columna: UPLC Waters Acquity BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm. Gradiente: 5 % - 95 % de acetonitrilo lineal durante 4,0 min (alternativamente, 8,0 min) a 0,4 ml/min. Detección: 214 nm (salida analógica de TUV (detector de UV ajustable)) modo de ionización MS: API-ES Barrido: 100-2000 amu (alternativamente, 500-2000 amu), etapa 0,1 amu.

Método: LCMS_13

60 El método LCMS_13 se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC SQD 2000 que consiste en un sistema UPLC con detector PDA UV y detector de masa cuadrípulo único con ionización por electropulverización. Eluyentes: A: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua; B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo. Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 100 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm. Gradiente: Lineal 10 % - 90 % B durante 3 min, flujo 0,3 ml/min, tiempo total de ejecución 4 min. Intervalo de escaneo MS: 500-2000 amu.

Método: LCMS_AP

65

Se usó un espectrómetro de masas Micromass Quatro micro API para identificar la masa de la muestra después de la elución de un sistema de HPLC compuesto por un módulo de gradiente binario Waters2525, un gestor de muestras Waters2767, un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 y un detector ELS Waters 2420. Eluyentes: A: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua; B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo. Columna: Phenomenex Synergi MAXRP, 4 um, 75x4,6 mm. Gradiente: 5 % - 95 % B durante 7 min a 1,0 ml/min.

Métodos de UPLC

Método 04_A3_1

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

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

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

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

Se usó el siguiente gradiente lineal: 75 % A, 25 % B a 45 % A, 55 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,35 ml/min.

Método 04_A4_1

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

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

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

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

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

Método: 04_A2_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron mediante el uso una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7um, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 90 % H₂O, 10 % CH₃CN, 0,25 M bicarbonato de amonio; B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente lineal: 90 % A, 10 % B a 60 % A, 40 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

Método: 04_A6_1

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

Método: 04_A7_1

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

Método: 04_A9_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron mediante el uso una columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18,

ES 2 767 705 T3

C18, 1,7µm, 2,1 mm x 150 mm, 60 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: Na₂SO₄ 200 mM + Na₂HPO₄ 20 mM + NaH₂PO₄ 20mM en 90 % H₂O/10 % CH₃CN, pH 7,2; B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O. Se usó el siguiente gradiente por etapas: 90 % A, 10 % B a 80 % A, 20 % B durante 3 minutos, 80 % A, 20 % B a 50 % A, 50 % B durante 17 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

5

Método 05_B5_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C.

10

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

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

15

B: 70 % CH₃CN, 30 % H₂O

Se usó el siguiente gradiente lineal: 60 % A, 40 % B a 30 % A, 70 % B durante 8 minutos a una velocidad de flujo de 0,35 ml/min.

20

Método: 05_B7_1

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

25

Método: 05_B8_1

30

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

35

Método: 05_B9_1

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

40

Método: 05_B10_1

45

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

50

Método: 07_B4_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C.

55

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

60

Método: 09_B2_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron mediante el uso una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18,

65

ES 2 767 705 T3

130Å, 1,7µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 40 % A, 60 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

5 Método: 09_B4_1

El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron mediante el uso una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

Método 08_B2_1

15 El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C.

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

20

A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA

B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA

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

Método 08_B4_1

30 El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C.

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

35

A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA

B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA

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

Método 10_B4_2

45 El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 50 °C.

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

50

A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA

B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA

55 Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 12 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

Método 10_B5_2

60 El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 50 °C.

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

65

A: 70% MeCN, 30% Agua

B: 0,2 M Na₂SO₄, 0,04 M H₃PO₄, 10 % MeCN, pH 2,25

Se usó el siguiente gradiente lineal: 40 % A en 1 min, 40 --> 70 % de A en 7 min a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

5 Método: 10_B14_1

El análisis RP se llevó a cabo mediante el uso un sistema Waters UPLC ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214nm y 254nm se recogieron mediante el uso una columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 1,7um, 2,1 mm x 150 mm, 50 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 70 % A, 30 % B a 40 % A, 60 % B durante 12 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

Método: AP_B4_1

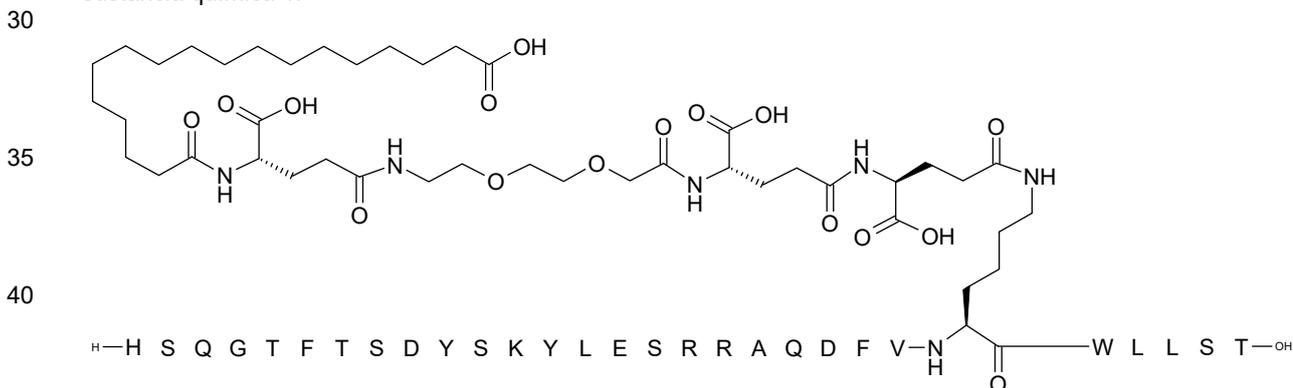
15 El análisis RP se realizó mediante el uso de un sistema UPLC de Waters ajustado con un detector de doble banda. Las detecciones UV a 214 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130 Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 30 °C.

El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían: A: 99,95 % H₂O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH₃CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,30 ml/min.

Ejemplo 1

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu¹⁵,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 1:



45 Método de UPLC: 04_A9_1: Rt =12,84 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,61 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 3,7 min, m/3 = 1427; m/4 = 1071; m/5 = 857

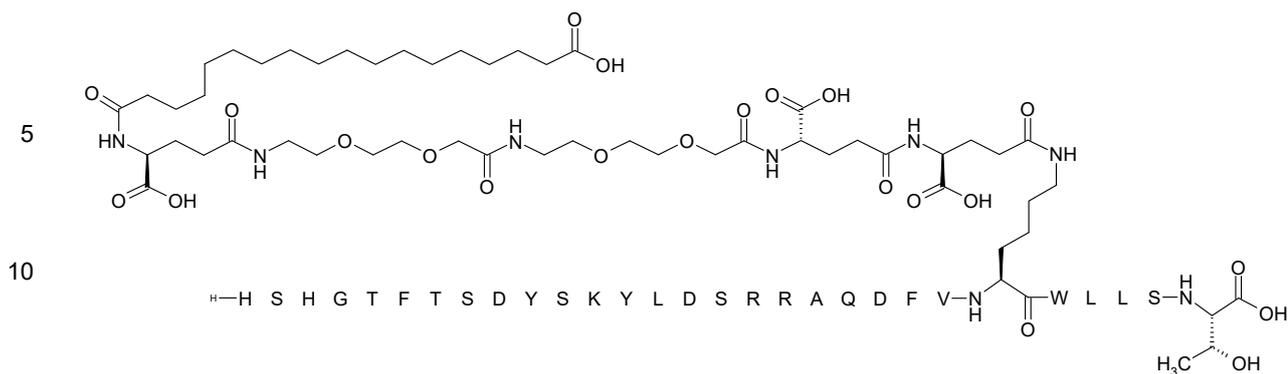
50 Ejemplo 2

55 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 2:

60

65



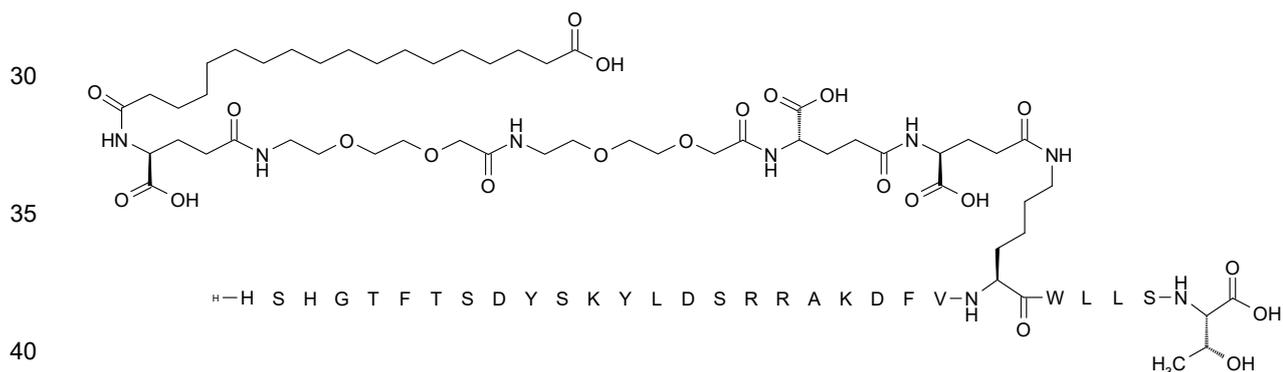
Método de UPLC: 05_B9_1: Rt = 8,4

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,8 min, m/4 = 1106

20 Ejemplo 3

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Lys²⁰,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

25 Sustancia química 3:



Método de UPLC: 04_A9_1: Rt =13,1 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,0 min

45 Método de LCMS: LCMS_4: RT = 2,8 min, m/3 = 1474; m/4 = 1106; m/5 = 885

Ejemplo 4

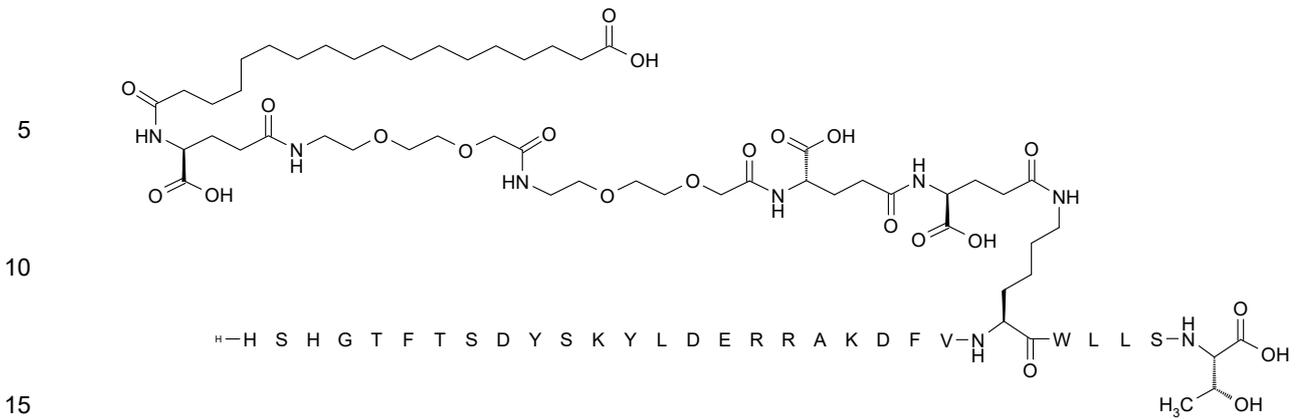
50 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Glu¹⁶,Lys²⁰,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

55 Sustancia química 4:

55

60

65



Método de UPLC: 04_A9_1: Rt =12,0 min

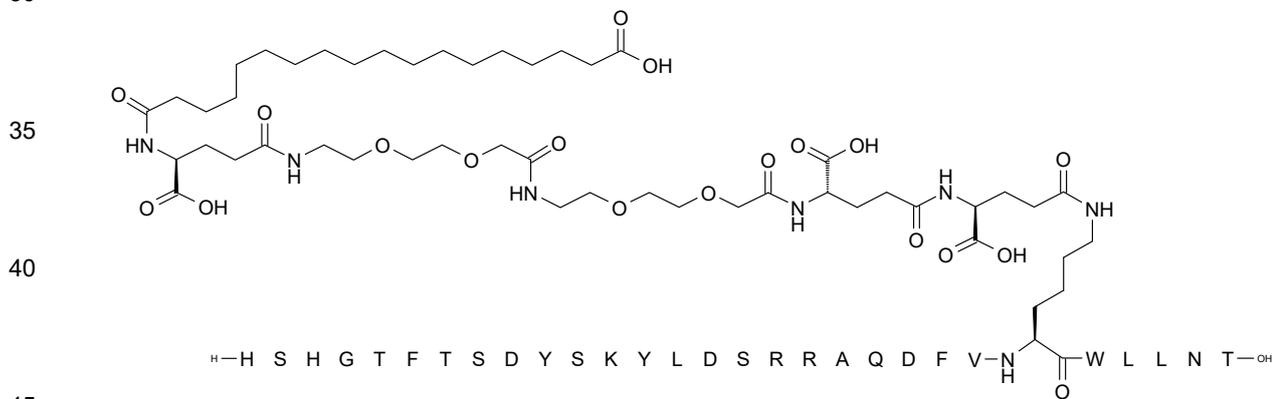
Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,0 min

Método de LCMS: LSMS_4: RT = 2,8 min, m/3 = 1488; m/4 = 1117; m/5 = 893

Ejemplo 5

25 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Lys²⁴,Leu²⁷]-Glucagón

Sustancia química 5:



Método de UPLC: 09_B4 Rt=8,29 min

Método de UPLC: Rt= 7,66 min

LCMS: Método: LCMS_4 Rt= 2,85; m/Z=4452; M/3: 1483, M/4: 1113

Ejemplo 6

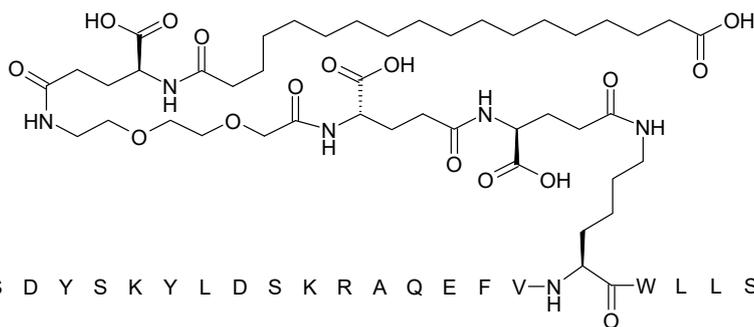
55 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Lys¹⁷,Glu²¹,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 6:

60

65

5



10



15

Método de UPLC: 04_A9_1; Rt = 12,2 min

Método de UPLC: 09_B4_1; Rt = 8,2 min

20

Método de LCMS: LCMS_4; RT=2,1 min; m/3 = 1421; m/4 = 1066; m/5 = 853

Ejemplo 7

25

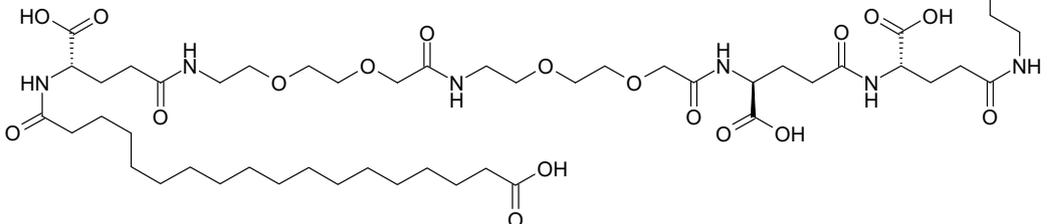
N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷]-Glucagón

sustancia química 7:

30



35



40

45

Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,1 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 12,9 min

50

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1485; m/4 = 1114; m/5 = 891

Ejemplo 8

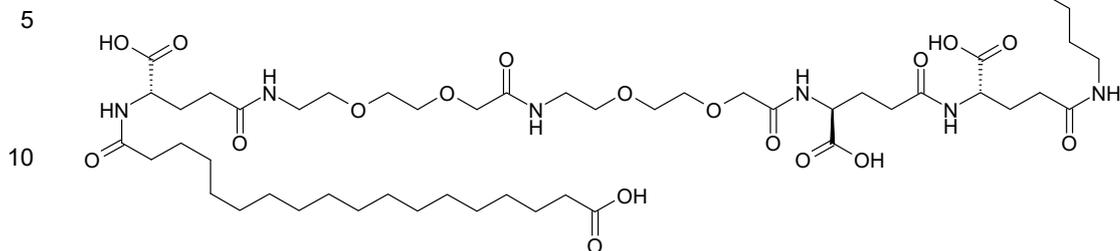
55

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ile¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷]-Glucagón

Sustancia química 8:

60

65



15 Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,2 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,7 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt 13,6 min

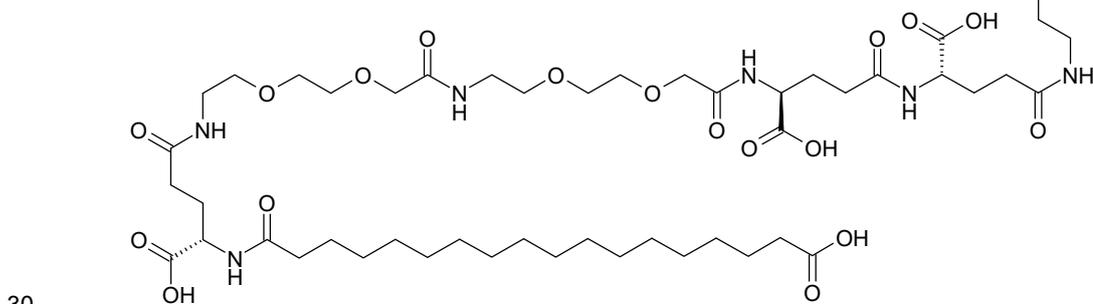
20

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1489; m/4 = 1117; m/5 = 894

Ejemplo 9

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[His³,Glu¹⁵,Thr¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷]-Glucagón

Sustancia química 9:



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 12,4 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,2 min

35

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 12,7 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1493; m/4 = 1120; m/5 = 896

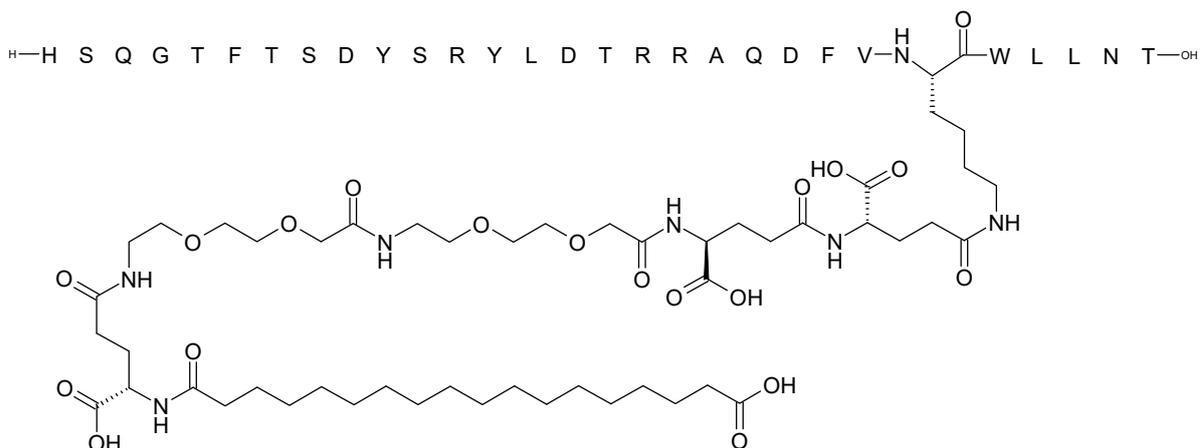
40 Ejemplo 10

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Thr¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷]-Glucagón

45

Sustancia química 10:

50



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 12,6 min

20

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,3 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 13,4 min

25

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1495, m/4 = 1121; m/5 = 897

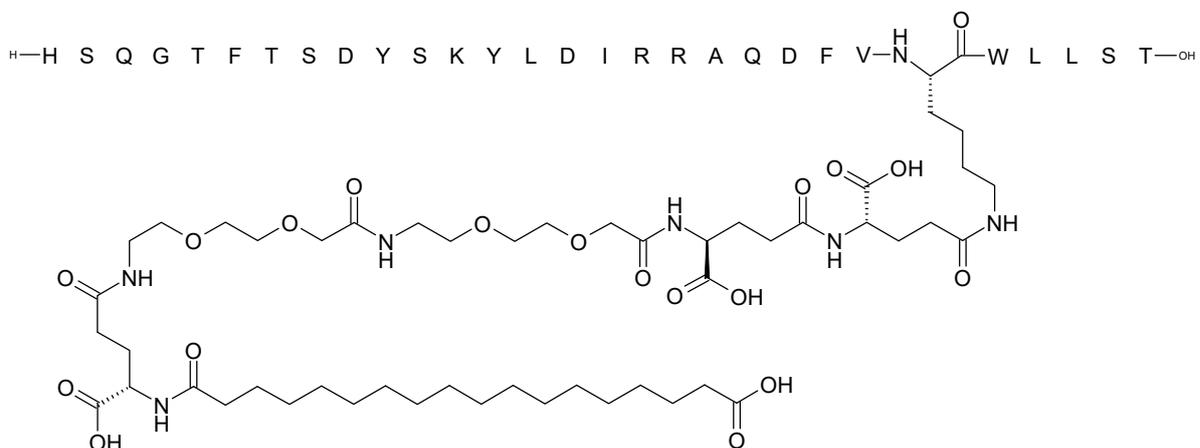
Ejemplo 11

30

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ile¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 11:

35



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,1 min

55

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,0 min

60

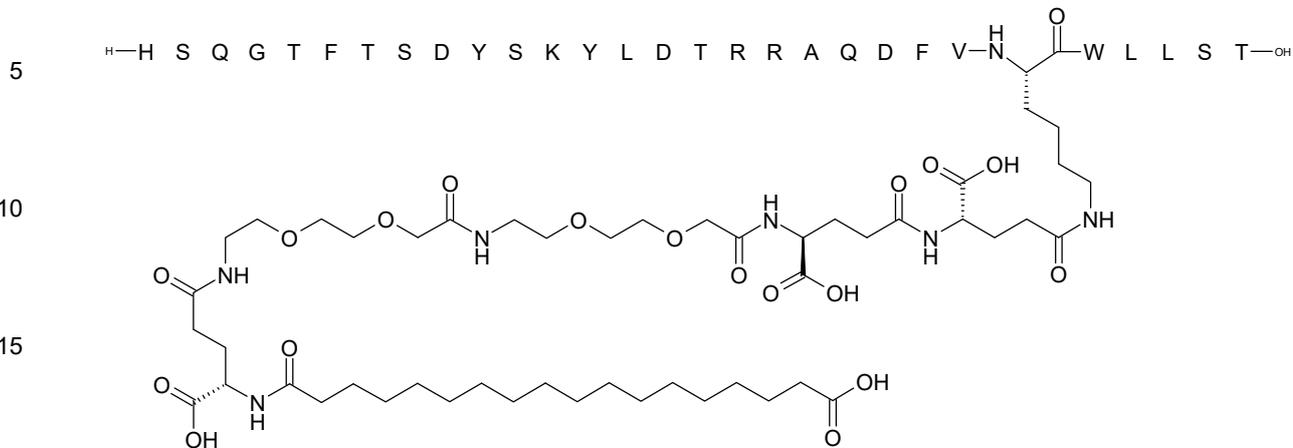
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1480; m/4 = 1110; m/5 = 889

Ejemplo 12

65

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Thr¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 12:



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 12,7 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,4 min

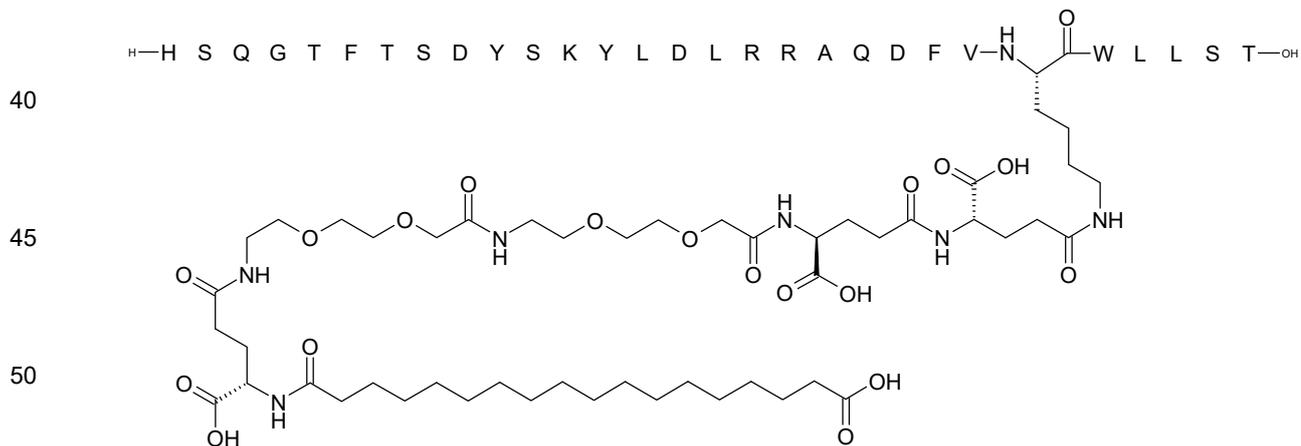
25 Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 12,9 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107; m/5 = 886

Ejemplo 13

30 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 13:



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,1 min

55 Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

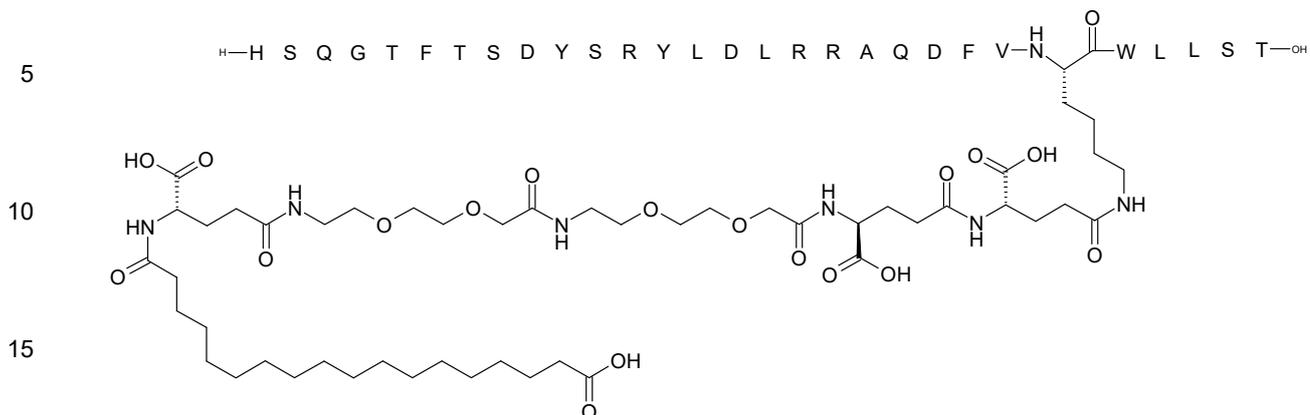
Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,0 min

60 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1480; m/4 = 1110; m/5 = 889

Ejemplo 14

65 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Glu¹⁵,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 14:



Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,4 min

20

Método de UPLC: 04_A6_1: Rt = 5,9 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 13,0 min

25

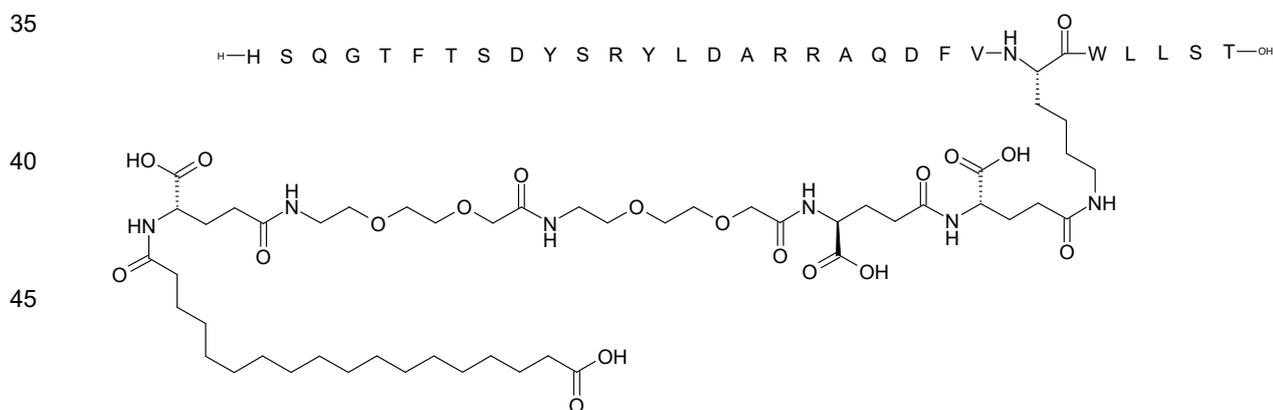
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1486; m/4 = 1115; m/5 = 892

Ejemplo 15

30

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 15:



Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,7 min

Método de UPLC: 04_A6_1: Rt = 7,2 min

55

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 16,0 min

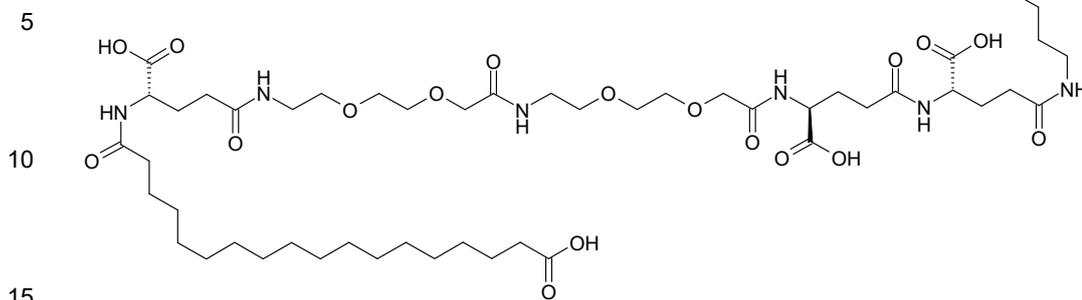
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1490; m/4 = 1117; m/5 = 894

Ejemplo 16

60

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Ala¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

65 sustancia química 16:



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 12,7 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,4 min

20

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 14,0 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107; m/5 = 886

25 Ejemplo 17

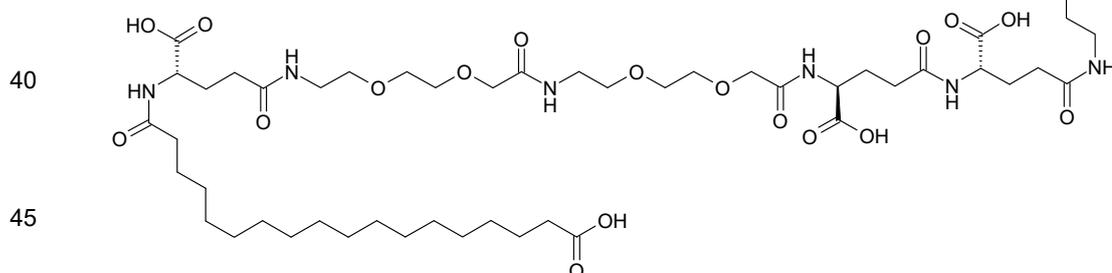
N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Phe¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

30

Sustancia química 17:



35



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,1 min

50

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,9 min

55 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1501; m/4 = 1126; m/5 = 901

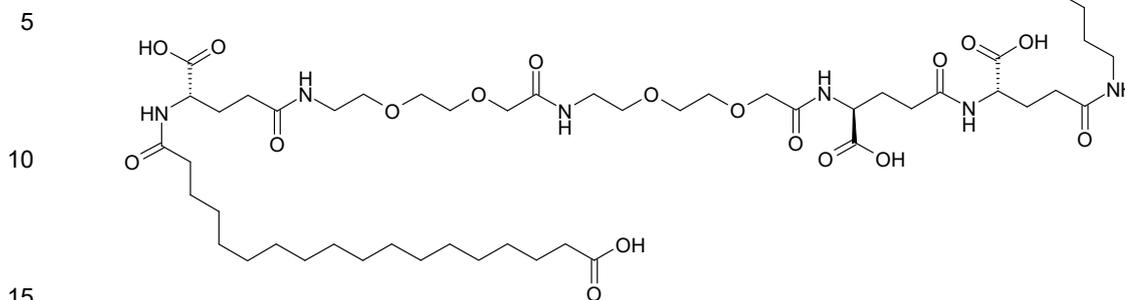
Ejemplo 18

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ile²⁸]-Glucagón

60

sustancia química 18:

65



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

20

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,4 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1499; m/4 = 1124; m/5 = 899

25 Ejemplo 19

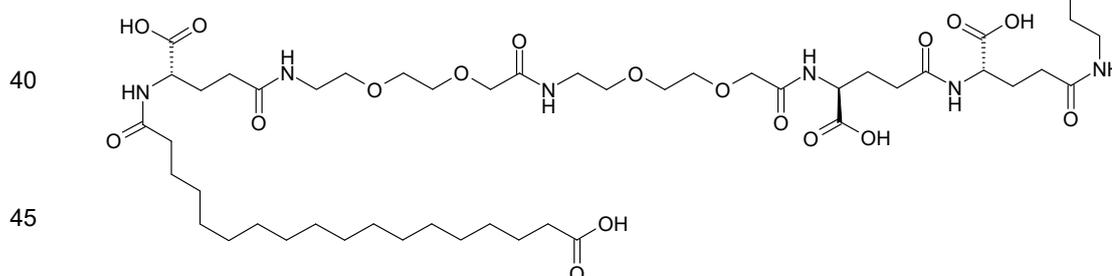
N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Thr²⁸]-Glucagón

30

sustancia química 19:



35



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,1 min

50

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,6 min

55 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1494; m/4 = 1121; m/5 = 897

Ejemplo 20

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Arg¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

60

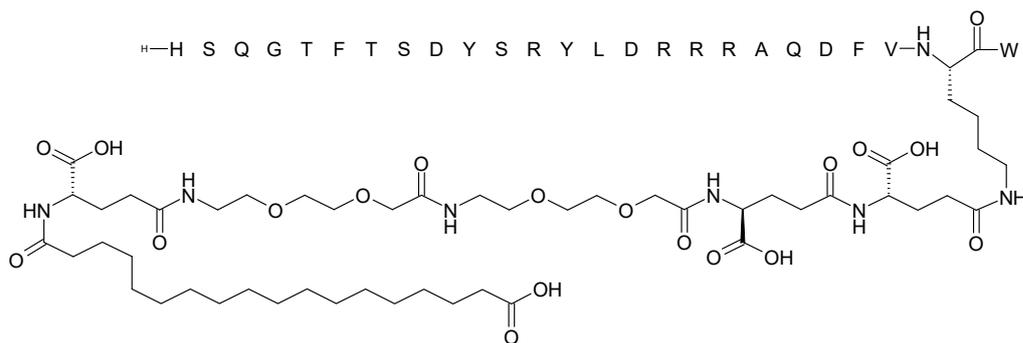
Sustancia química 20:

65



5

10



15 Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 10,6 min

Método de UPLC: 04_A6_1: Rt = 5,9 min;

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min; m/3 = 1504; m/4 = 1128; m/5 = 903

20

Ejemplo 21

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Val¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

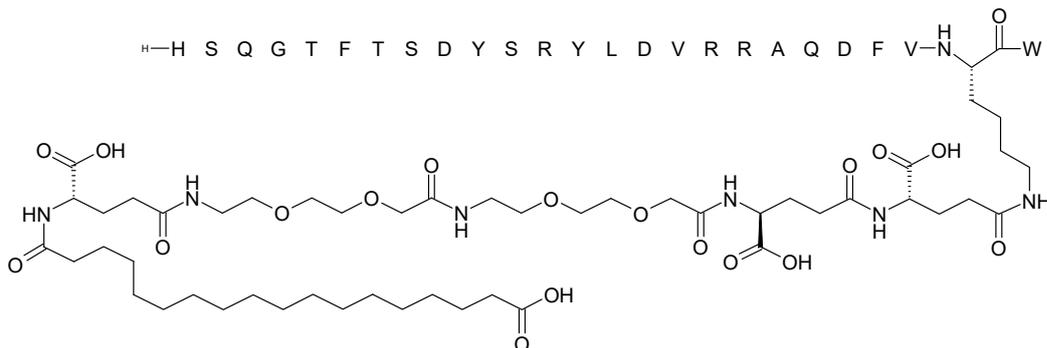
Sustancia química 21:

30



35

40



Método de UPLC: 10_B4_1: Rt = 8,5 min;

45 Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 14,5 min;

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min; m/3 = 1485; m/4 = 1114; m/5 = 891

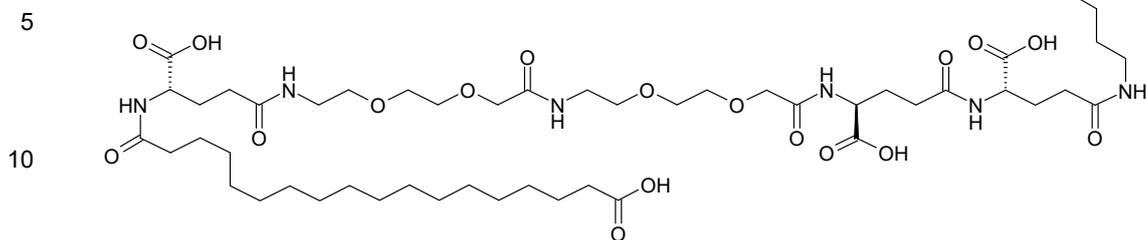
50 Ejemplo 22

55 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Thr¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

60 sustancia química 22:

65

65



15 Método de UPLC: 04_A9_1; Rt = 13,1 min

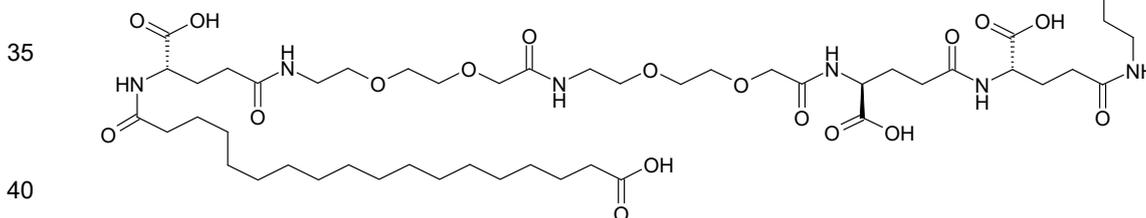
Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,4 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,2; m/3 =1485; m/4 = 1114; m/5 = 892

20 Ejemplo 23

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Ile¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 23:



Método de UPLC: 10_B4_1: Rt = 8,6 min;

45 Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,2 min;

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min; m/3 = 1490; m/4 = 1118; m/5 = 894

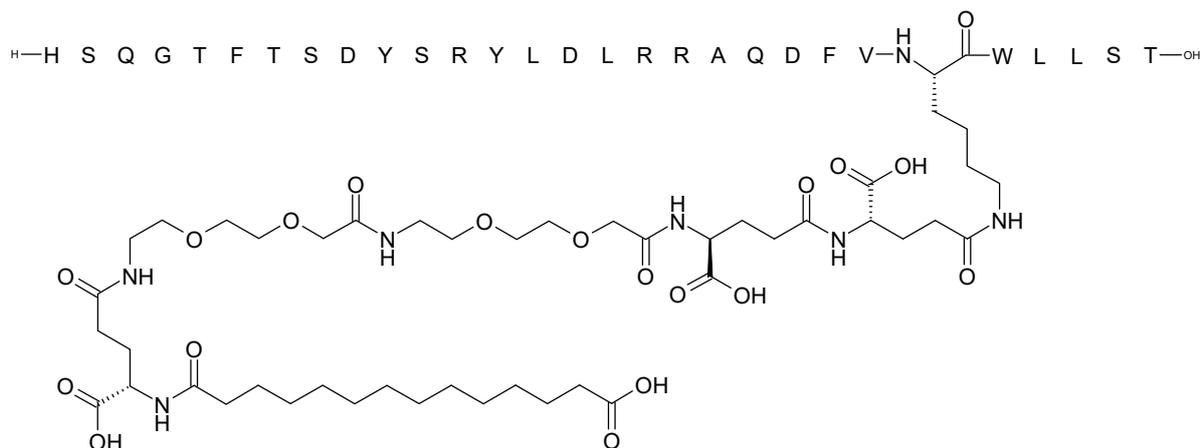
50 Ejemplo 24

55 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxytridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 24:

60

65



20 Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 11,7 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 7,7 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 13,2 min

25

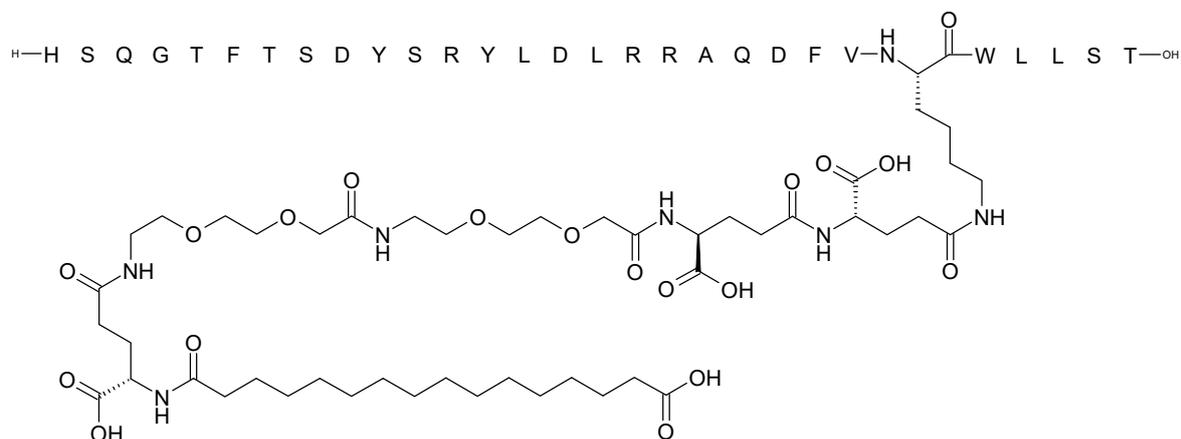
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1471; m/4 = 1103; m/5 = 883

Ejemplo 25

30 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 25:

35



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 12,4 min

55 Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,2 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 14,0 min

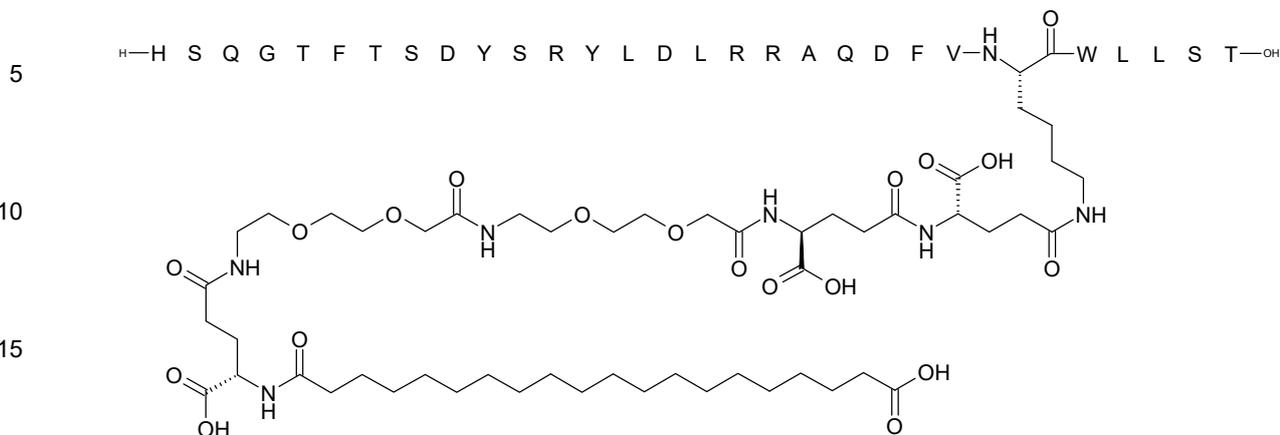
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1481; m/4 = 1110; m/5 = 889

60

Ejemplo 26

65 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxynonadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

sustancia química 26:



20 Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 14,0 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 9,2 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 16,6 min

25

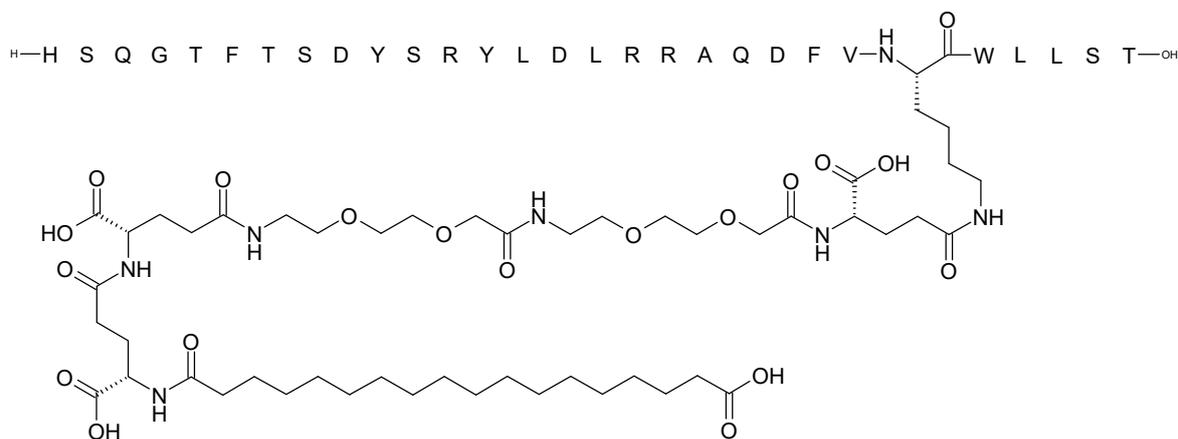
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1499; m/4 = 1124; m/5 = 900

Ejemplo 27

30 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 27:

35



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,0 min

55 Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 14,7 min

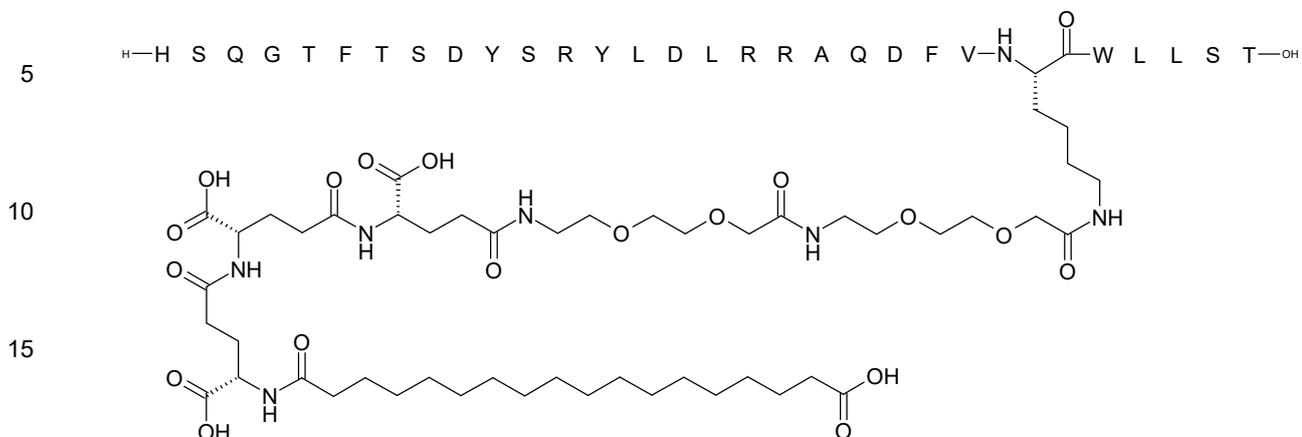
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1489; m/4 = 1117; m/5 = 894

60

Ejemplo 28

65 N^{E24}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 28:



20 Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,5 min

Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 14,7 min

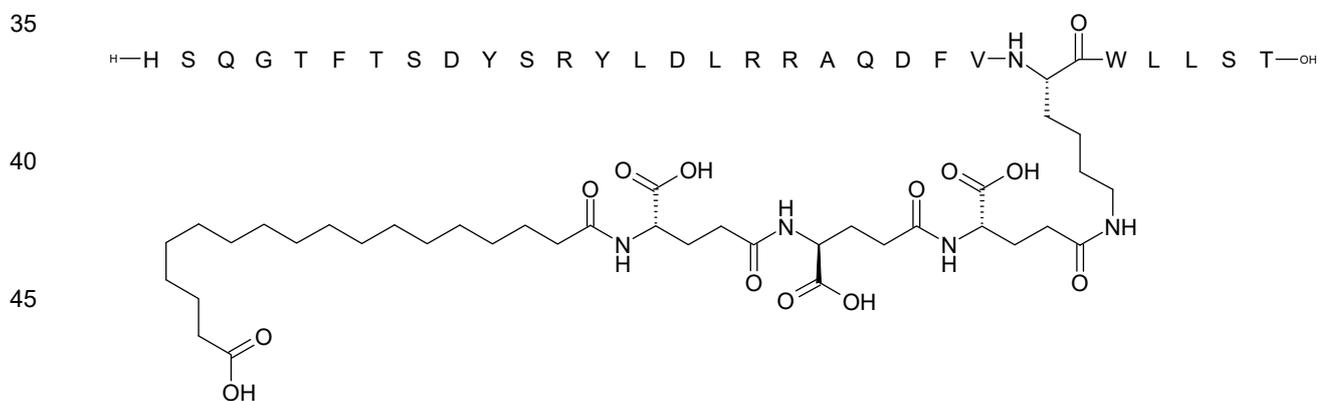
25

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1489; m/4 = 1117; m/5 = 894

Ejemplo 29

30 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg¹²,Leu¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

Sustancia química 29:



50

Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 13,2 min

Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,7 min

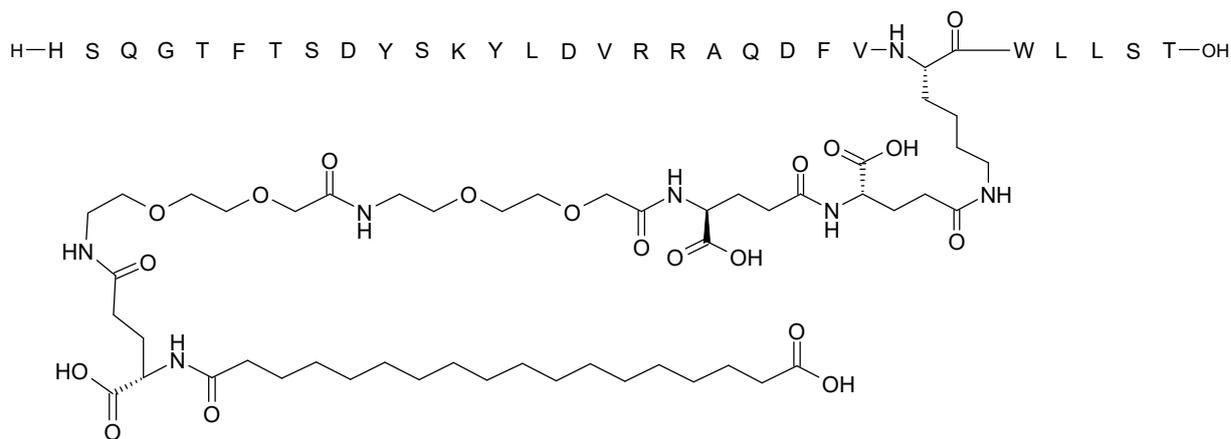
55 Método de UPLC: 04_A9_1: Rt = 15,2

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1392; m/4 = 1045; m/5 = 836

Ejemplo 30

60 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val¹⁶,Lys²⁴,Leu²⁷,Ser²⁸]-Glucagón

65 Sustancia química 30:



Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,6 min

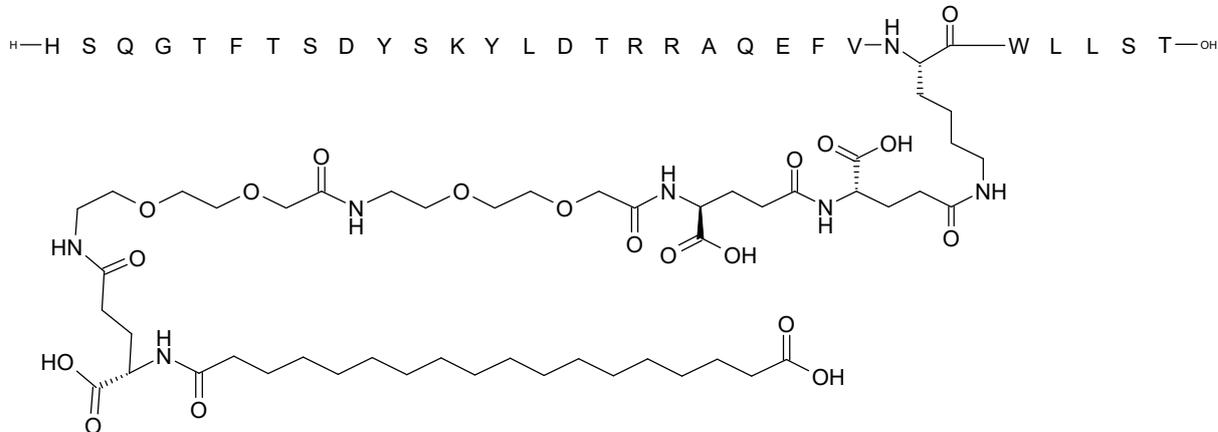
Método de UPLC: 04_A6_1; Rt= 7,3 min

Método de LC-MS: LCMS_4; Rt = 2,3, m/3 = 1475; m/4 = 1107; m/5 = 886

Ejemplo 31

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 31:



Método de UPLC: 10_B4_1; Rt = 8,4 min

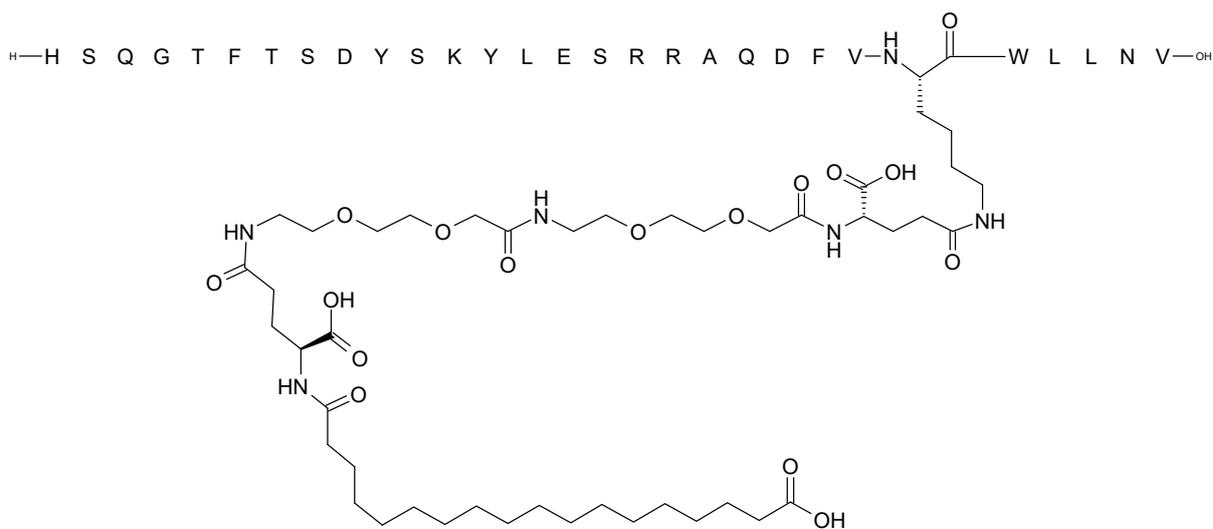
Método de UPLC: 04_A9_1; Rt = 13,3 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT = 2,2, m/3 = 1481; m/4 = 1111; m/5 = 889

Ejemplo 32

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Ile29]-Glucagón

Sustancia química 32:



Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,8 min

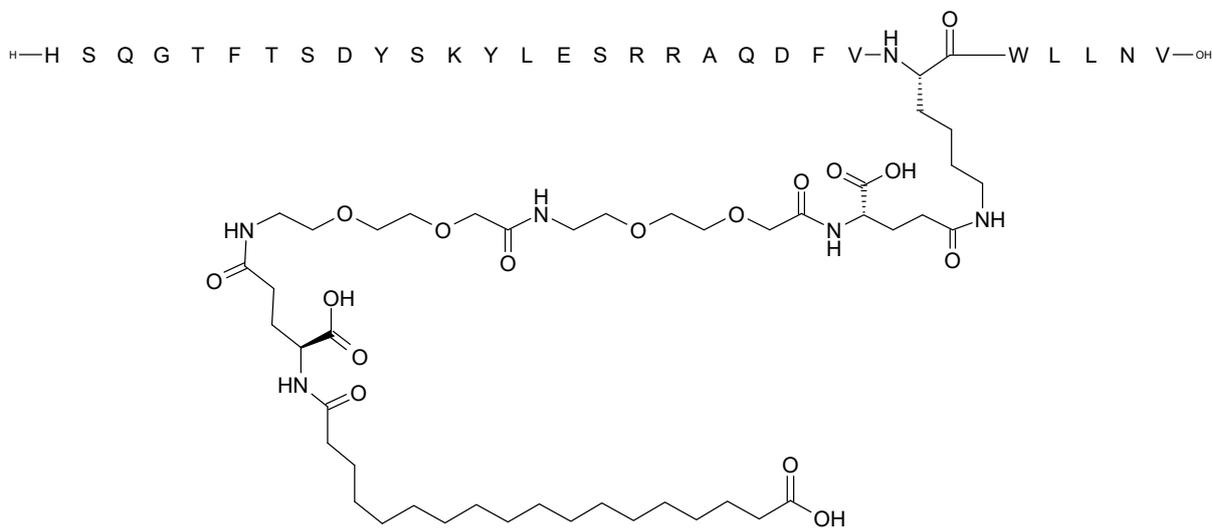
Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 13,5 min

25 Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,4, m/3 =1446; m/4 = 1085; m/5= 868

Ejemplo 33

30 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Val29]-Glucagón

Sustancia química 33:



55 Método de UPLC: 10_B4_1; Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 12,9 min

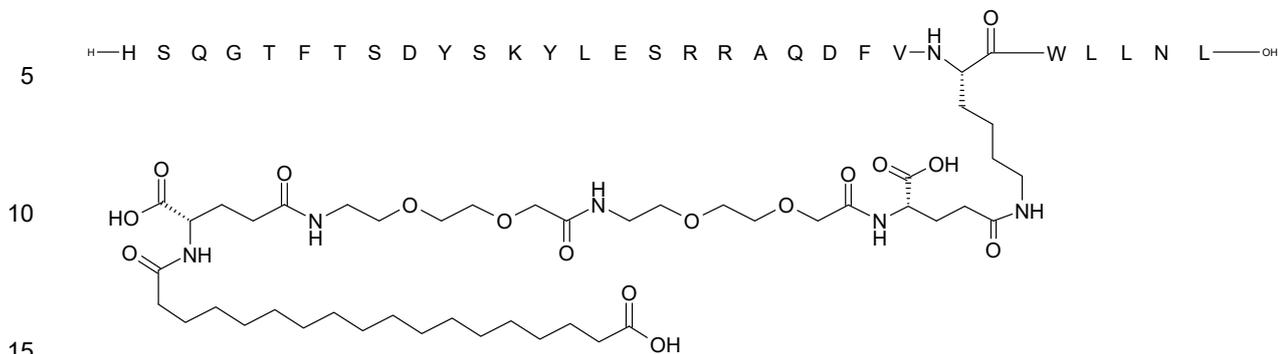
Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,4, m/3 = 1442; m/4 = 1081; m/5 = 865

60

Ejemplo 34

65 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Leu29]-Glucagón

Sustancia química 34:



Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,9 min

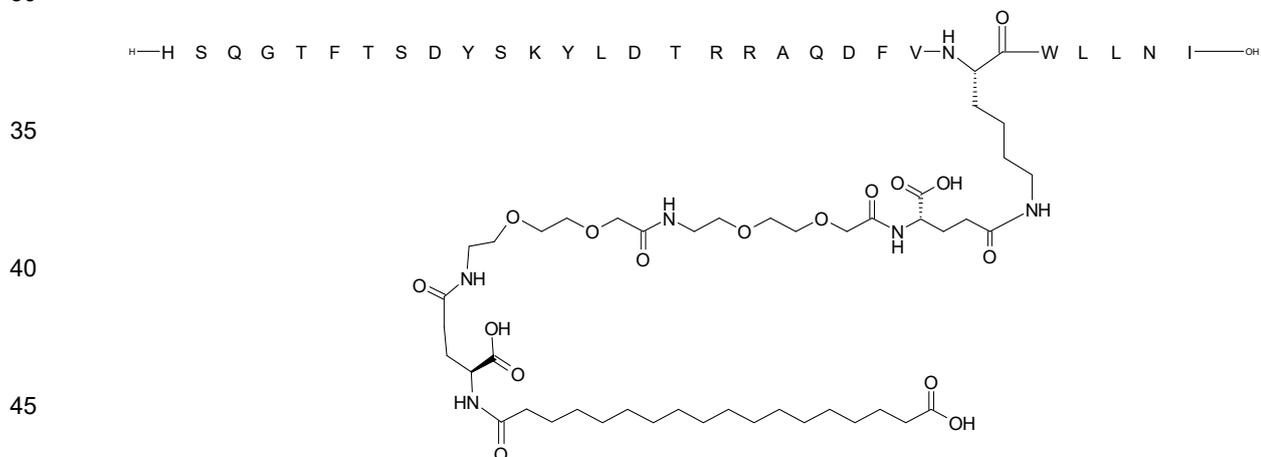
Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 13,8 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,5, m/3 = 1446; m/4 = 1085; m/5 = 868

Ejemplo 35

25 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Thr16,Lys24,Leu27,Ile29]-Glucagón

Sustancia química 35:



Método de UPLC: 09_B4_1; Rt= 8,8 min

Método de LC-MS: LCMS_4; Rt=2,4 min, m/3 = 1446; m/4 = 1085; m/5 = 868

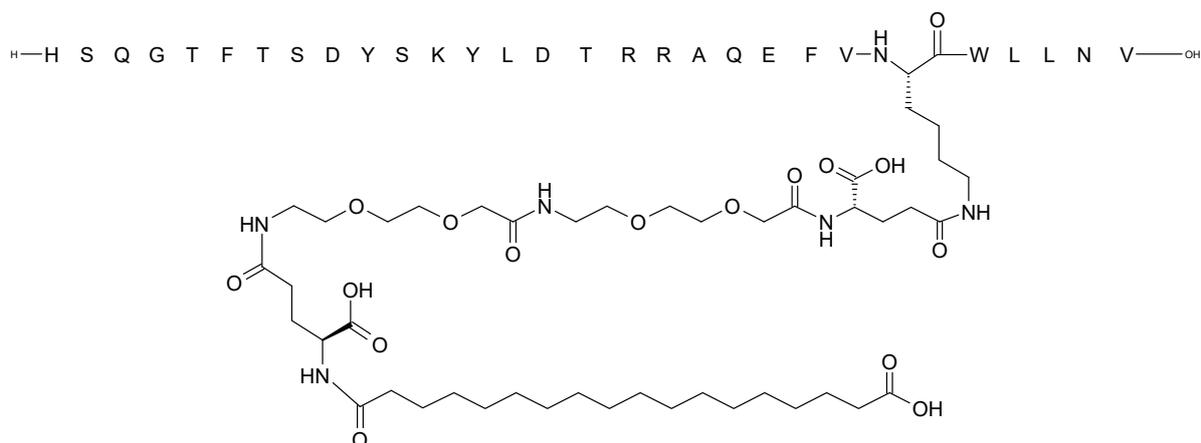
Ejemplo 36

55 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Val29]-Glucagón

Sustancia química 36:

60

65



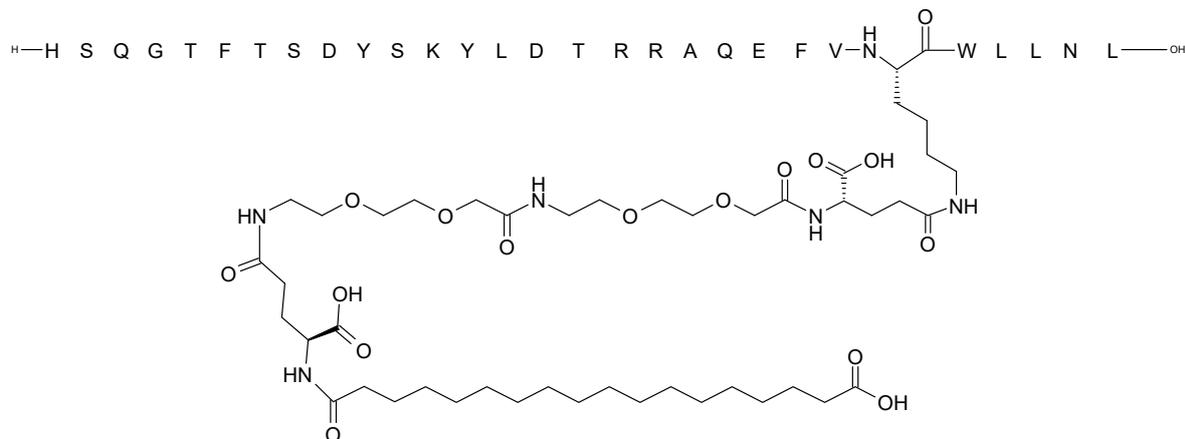
Método de UPLC: 09_B4_1; Rt= 8,6 min

Método de LC-MS: LCMS_4; Rt=2,3 min; m/4 = 1085; m/5 = 868

Ejemplo 37

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Leu29]-Glucagón

Sustancia química 37:



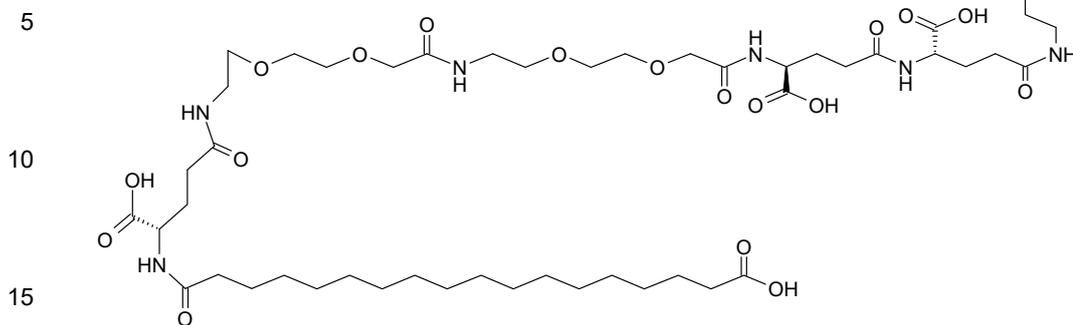
Método de UPLC: 09_B4_1; Rt= 8,9 min

Método de LC-MS:LCMS_2: Rt=6,2 min; m/3 = 1451, m/4 =1088

Ejemplo 38

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val10,Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 38:



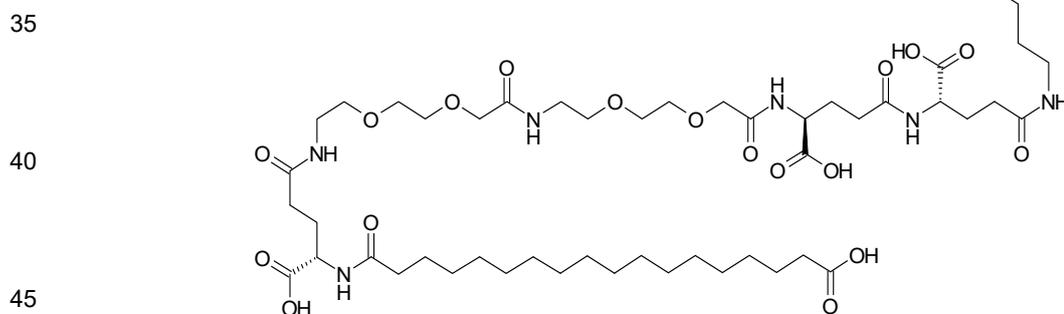
Método de UPLC: 06_B4_1: Rt= 8,4 min

20 Método de LC-MS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3=1494,1; m/4= 1120,5; m/5=896,8

Ejemplo 39

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Thr16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

Sustancia química 39:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,6 min

50 Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,3 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,3 min

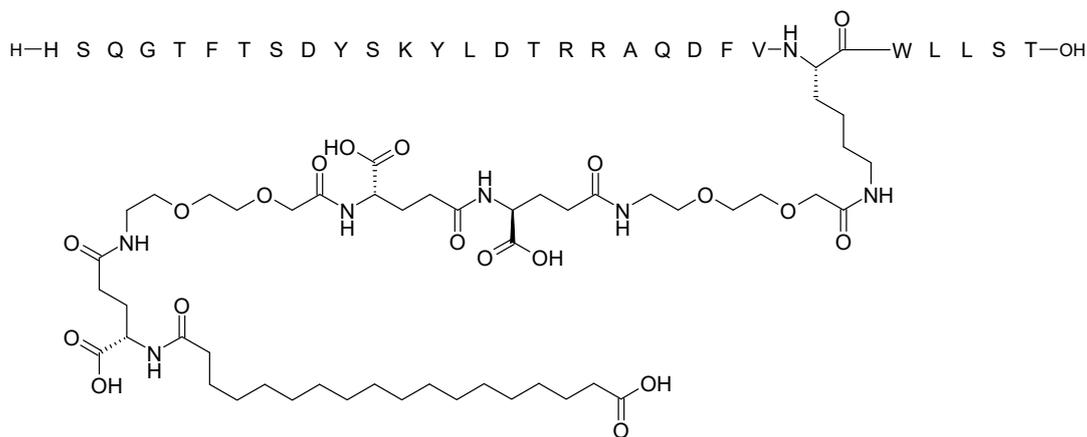
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107; m/5 = 886

55 Ejemplo 40

60 N^{ε24}-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Thr16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 40:

65



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,6 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,3 min

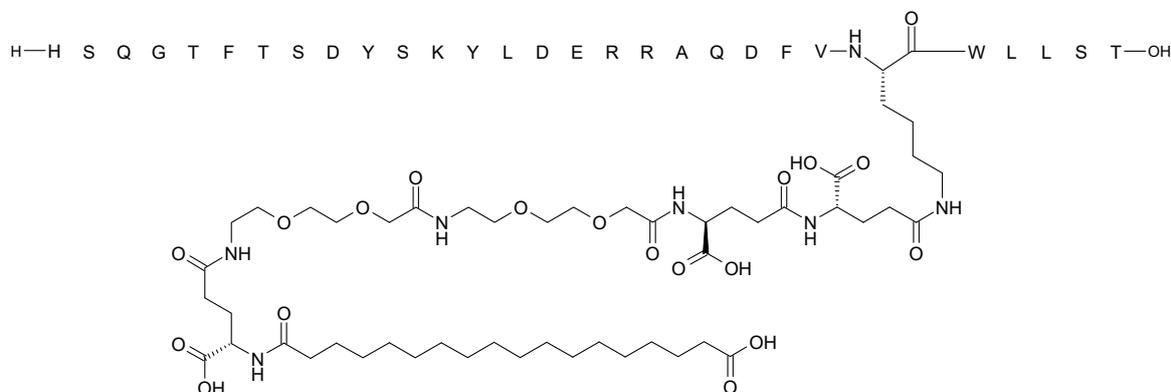
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107; m/5 = 886

Ejemplo 41

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 41:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,6 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,3 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,4 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min, m/3 = 1485; m/4 = 1114; m/5 = 892

Ejemplo 42

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Glu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

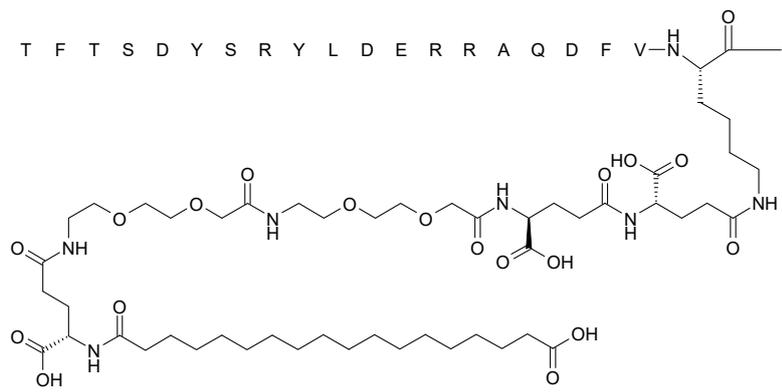
Sustancia química 42:



5

10

15



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,6 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,3 min

20 Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,4 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1495; m/4 = 1121; m/5 = 897

Ejemplo 43

25

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

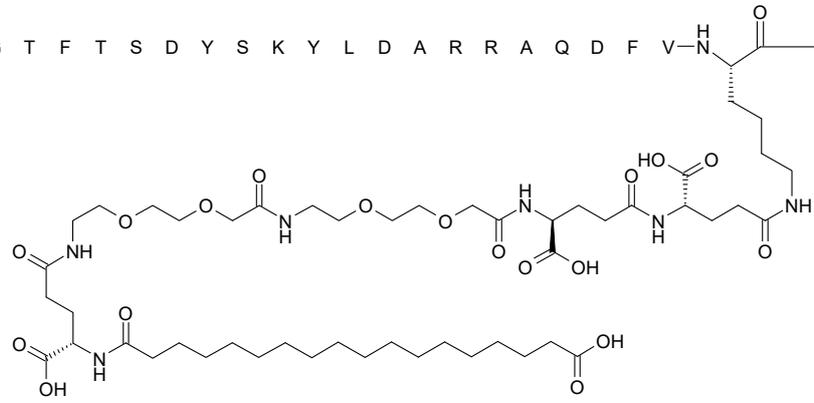
30 Sustancia química 43:



35

40

45



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,6 min

50 Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,4 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 13,2 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1466; m/4 = 1100; m/5 = 880

55

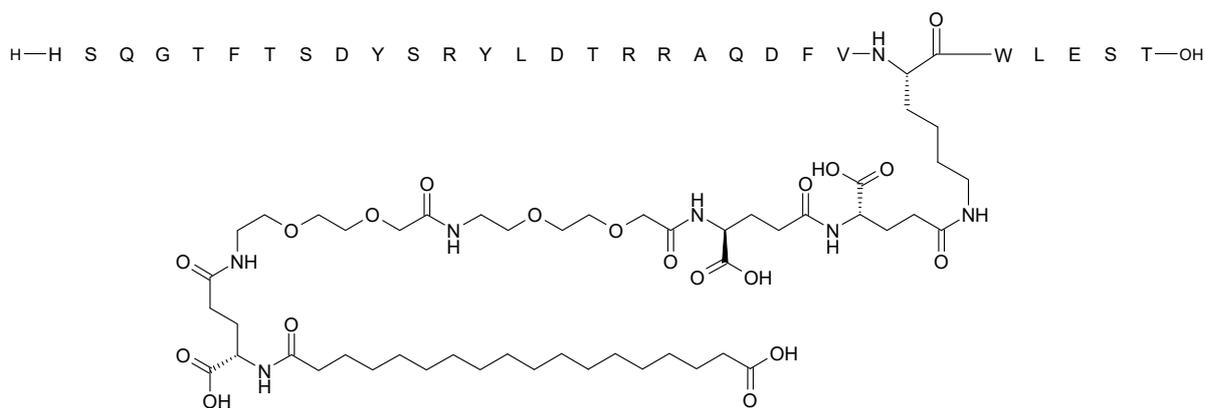
Ejemplo 44

60

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Thr16,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 44:

65



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 11,9 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 7,9 min

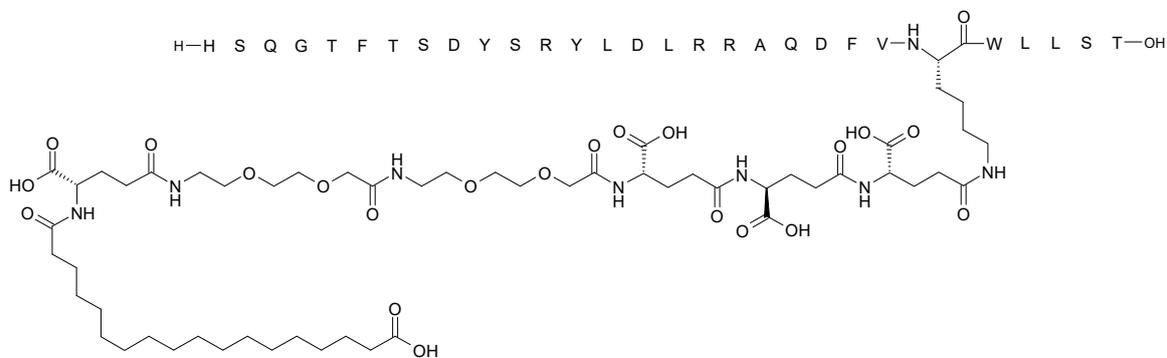
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 9,0 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,0 min, m/3 = 1491; m/4 = 1118; m/5 = 895

Ejemplo 45

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 45:



Método de UPLC: 09_B2_1: Rt = 14,0 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1532; m/4 = 1149; m/5 = 920

Ejemplo 46

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 46:

Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,9 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,4 min

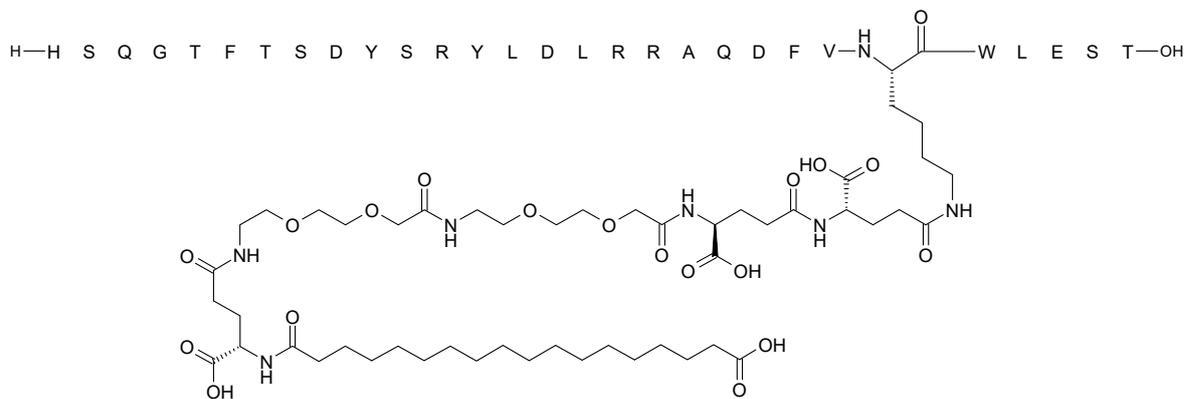
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1494; m/4 = 1121; m/5 = 897

Ejemplo 47

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 47:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,9 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,8 min

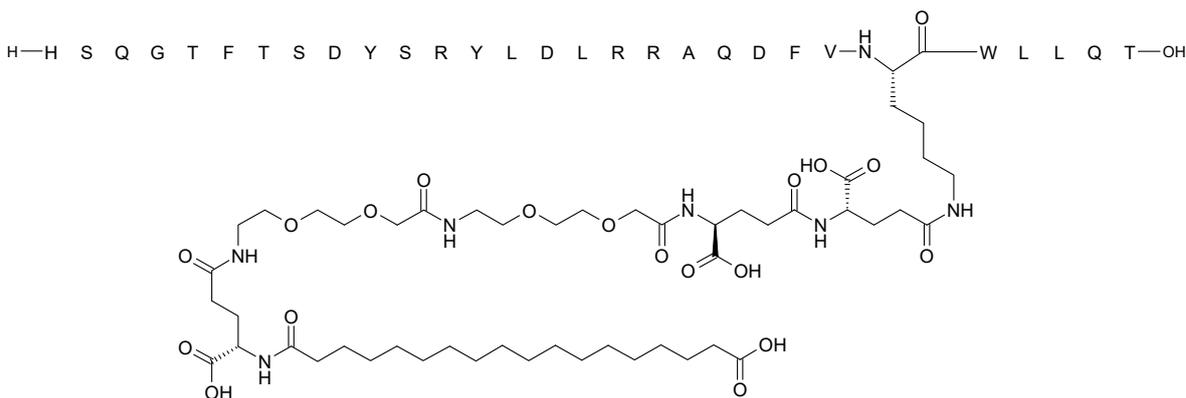
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 10,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min, m/3 = 1495; m/4 = 1121; m/5 = 897

Ejemplo 48

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Gln28]-Glucagón

Sustancia química 48:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,6 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,2 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 14,9 min

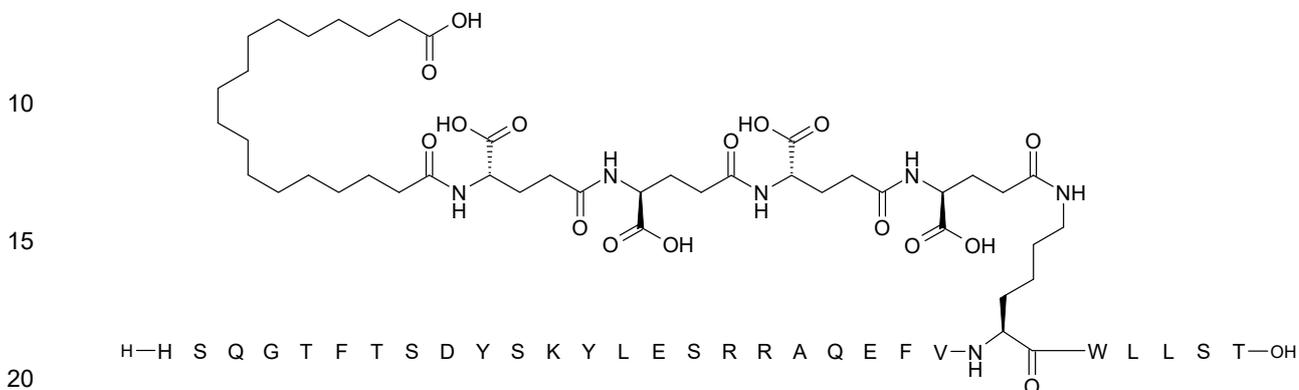
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1503; m/4 = 1127; m/5 = 902

Ejemplo 49

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

5

Sustancia química 49:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,1 min

25 Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,9 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,5 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min, m/3 = 1427; m/4 = 1070; m/5 = 857

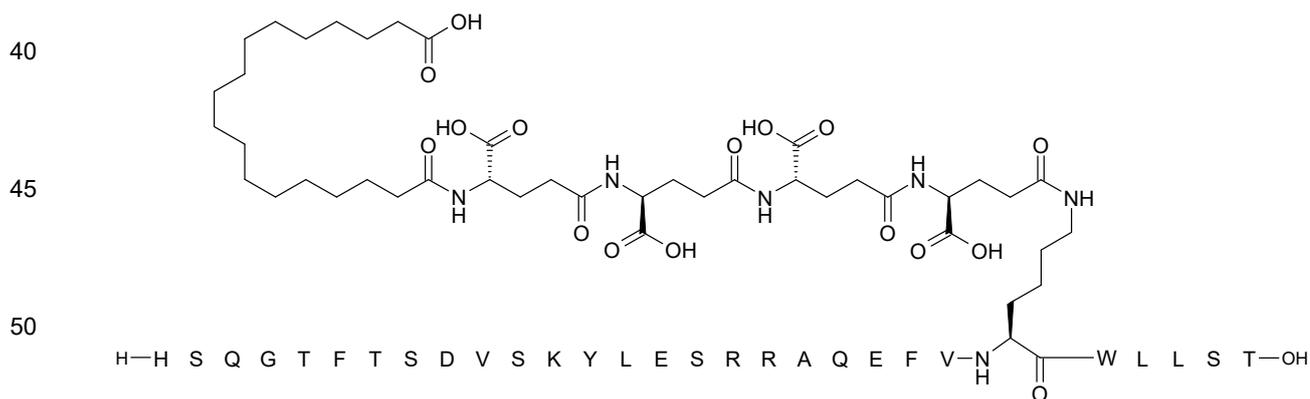
30

Ejemplo 50

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val10,Glu15,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

35

Sustancia química 50:



55 Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,2 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,0 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,0 min

60

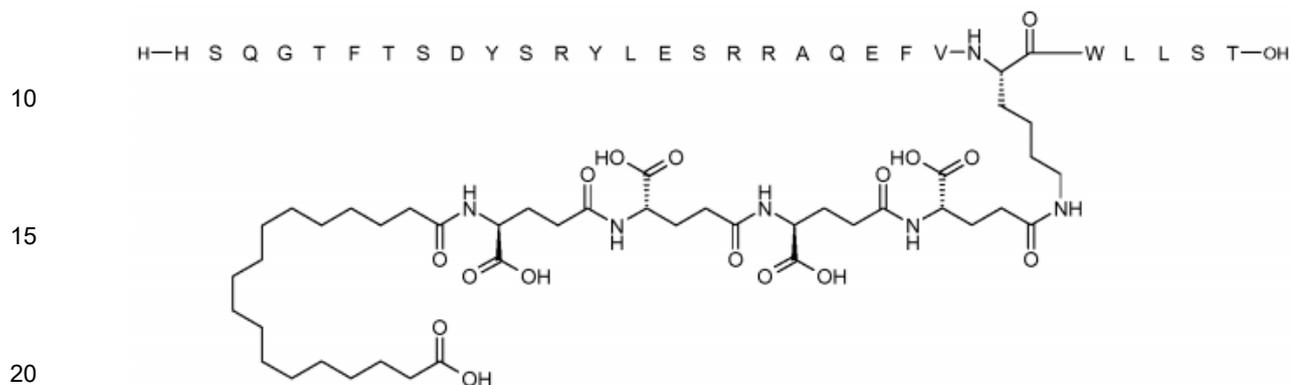
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1406; m/4 = 1054; m/5 = 844

Ejemplo 51

ES 2 767 705 T3

N^ε24-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12, Glu15, Glu21, Lys24, Leu27, Ser28]-Glucagón

5 Sustancia química 51:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,2 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,0 min

25

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,0 min

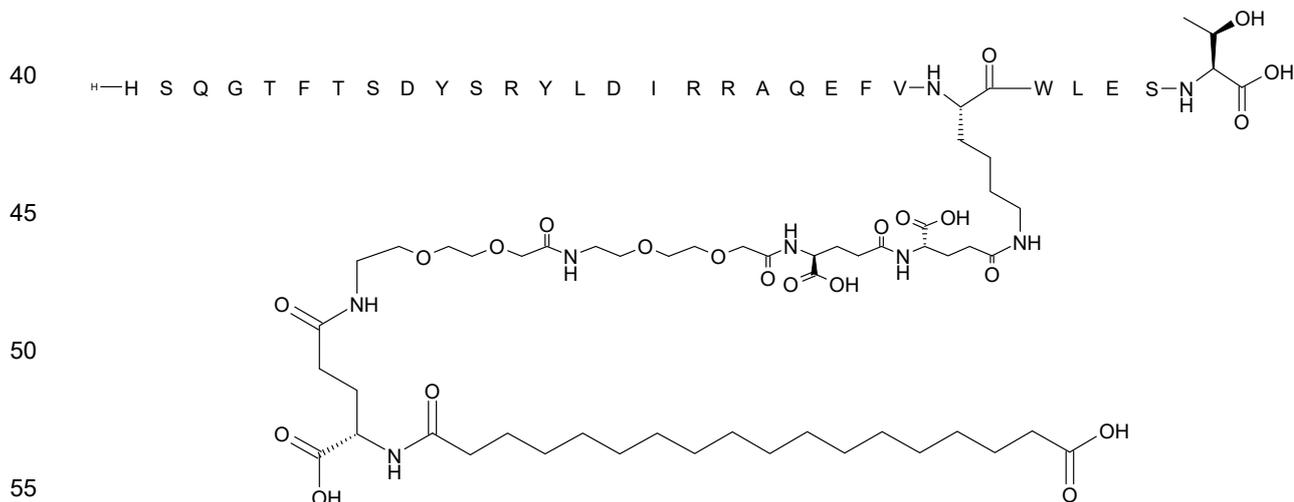
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1436; m/4 = 1077; m/5 = 862

30 Ejemplo 52

N^ε24-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12, Glu15, Glu21, Lys24, Leu27, Ser28]-Glucagón

35

Sustancia química 52:



Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 12,2 min

Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,3 min

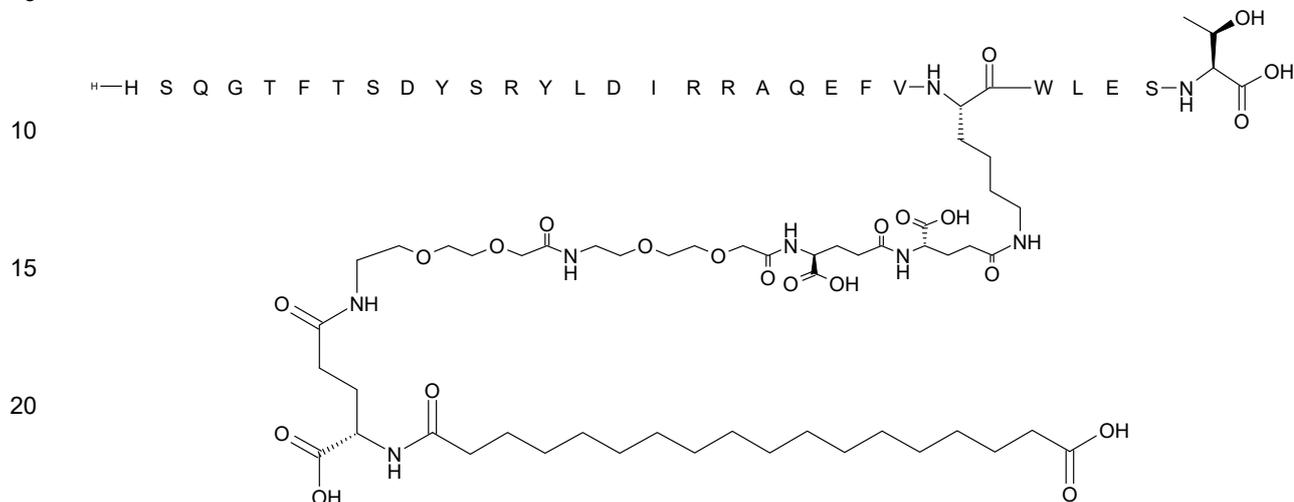
60

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,2, m/3 = 1490; m/4 = 1118; m/5 = 894

Ejemplo 53

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ile16,Glu21,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón
Sustancia química 53:

5



Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 11,0 min

Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,0 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,2, m/3 = 1499, m/4 = 1125, m/5 = 900

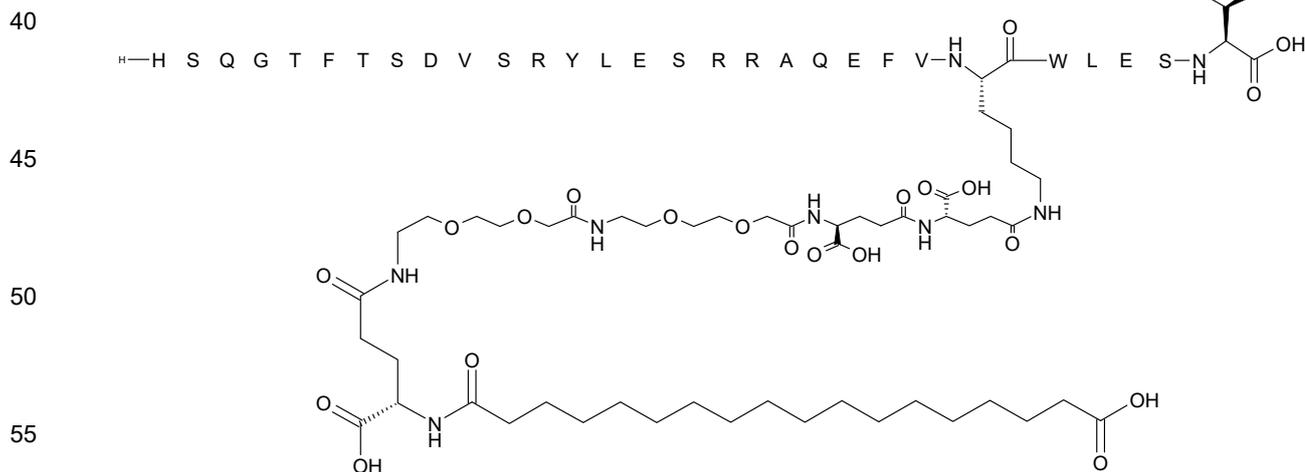
30

Ejemplo 54

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val10,Arg12,Glu15,Glu21,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

35

Sustancia química 54:



Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 9,0 min

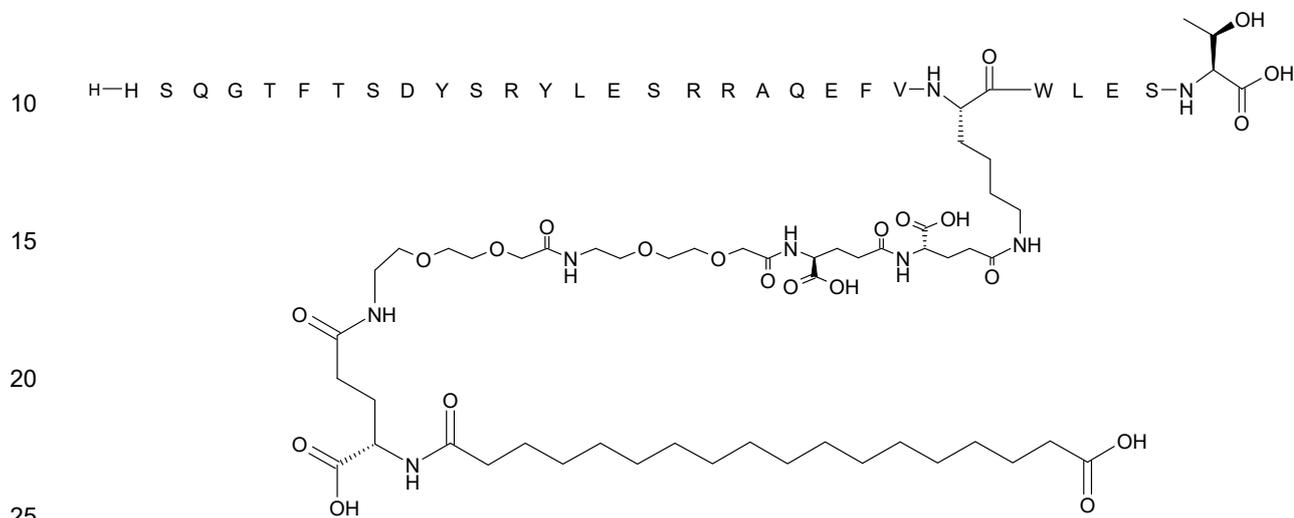
Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,1 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,2, m/3 = 1474; m/4 = 1106; m/5 = 885

Ejemplo 55

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Glu15,Glu21,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

5 Sustancia química 55:



Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 8,8 min

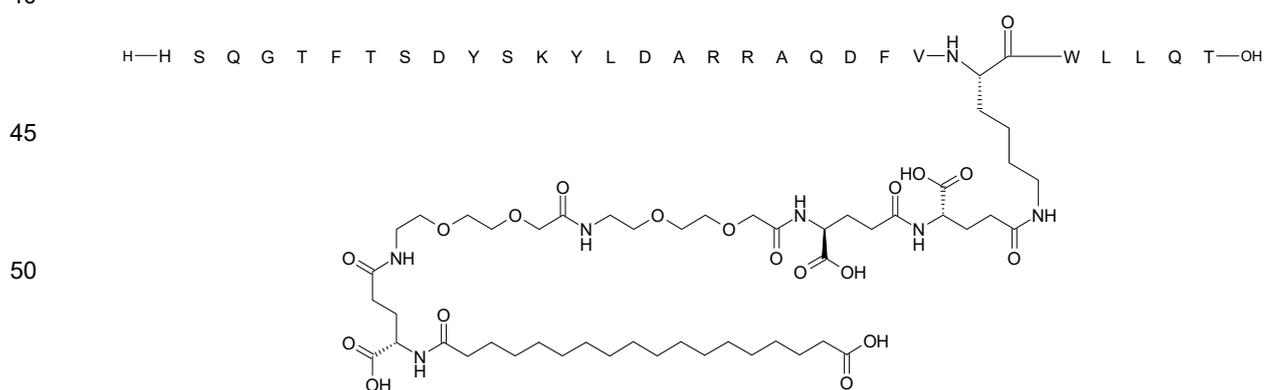
Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 8,1 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,2; m/3 =1495; m/4 = 1121; m/5 = 898

Ejemplo 56

35 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ala16,Lys24,Leu27,Gln28]-Glucagón

Sustancia química 56:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,3 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,0 min

60 Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 13,5 min

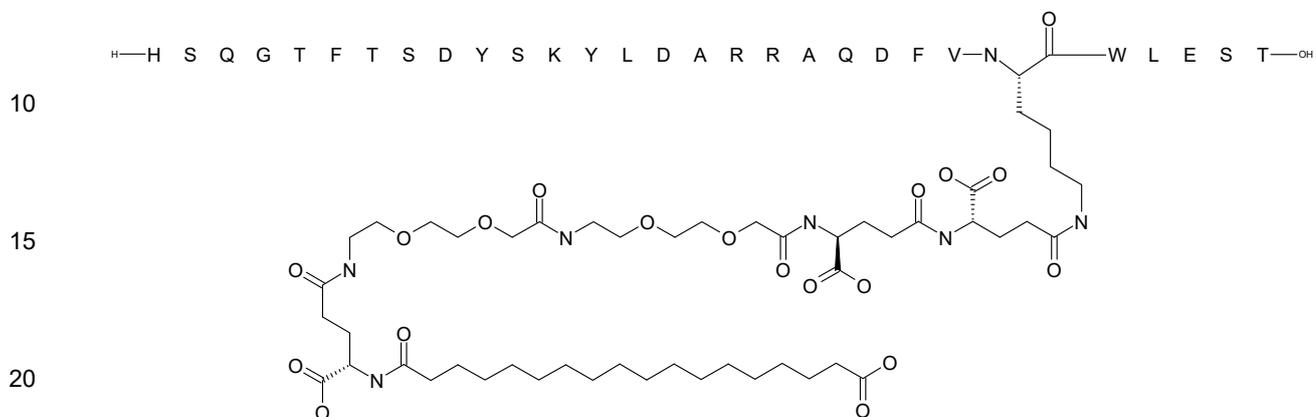
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1480; m/4 = 1110; m/5 = 888

Ejemplo 57

ES 2 767 705 T3

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ala16,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

5 Sustancia química 57:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,5 min

25 Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 9,5 min

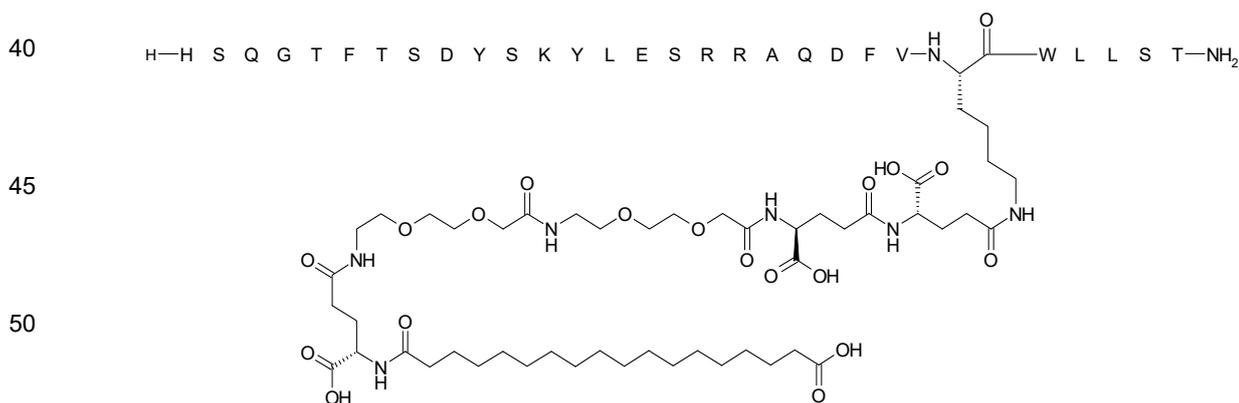
Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1471; m/4 = 1104; m/5 = 883

30 Ejemplo 58

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

35

Sustancia química 58:



55 Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,2 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 9,0 min

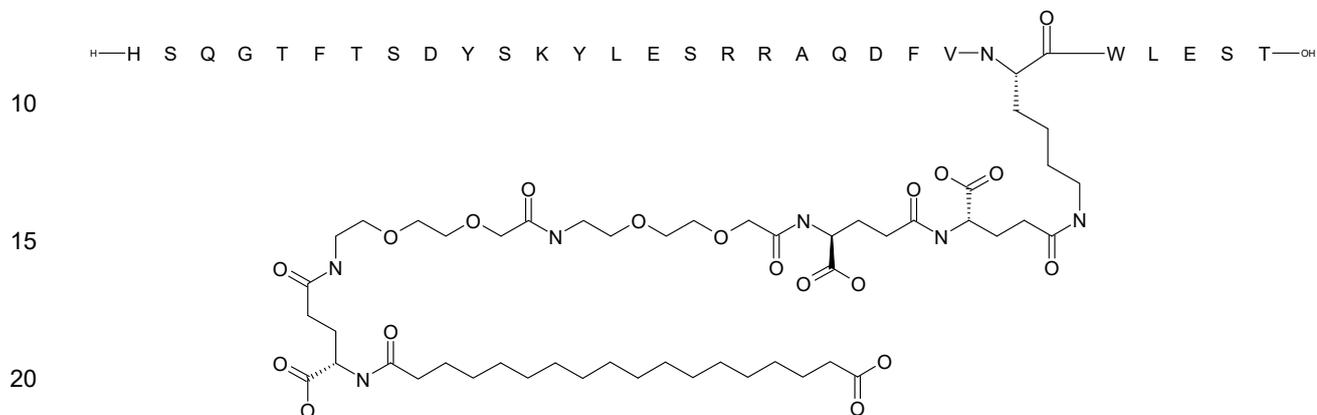
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 14,8 min

60 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107; m/5 = 886

Ejemplo 59

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Glu27,Ser28]-Glucagón

5 Sustancia química 59:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,5 min

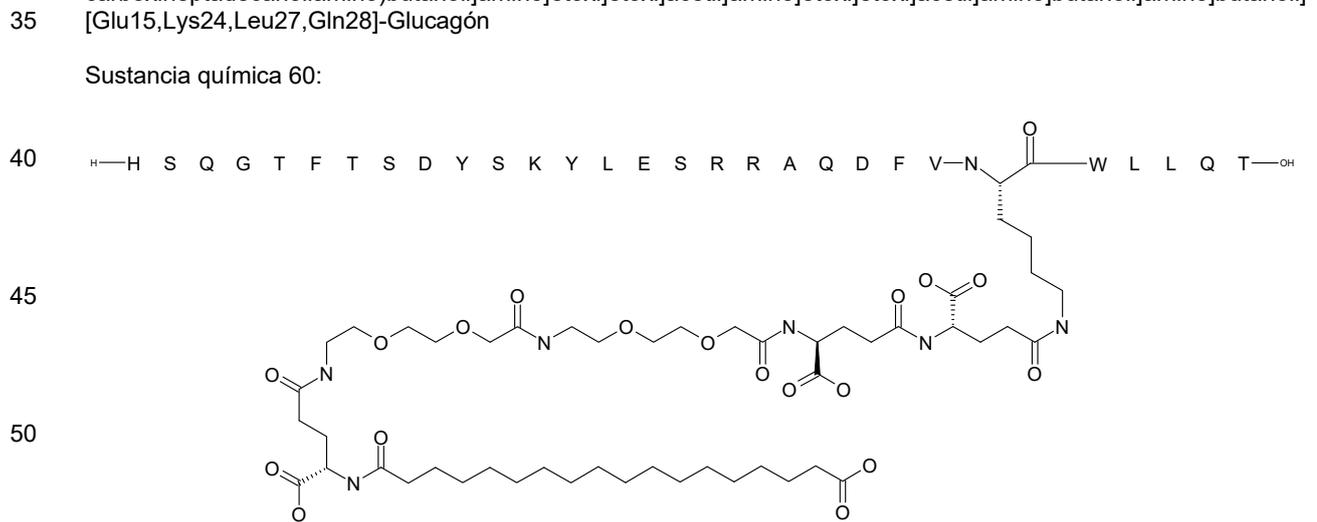
25 Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,5 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 8,6 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,1 min, m/3 = 1481; m/4 = 1111; m/5 = 889

30 Ejemplo 60

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Gln28]-Glucagón



55 Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,1 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,9 min

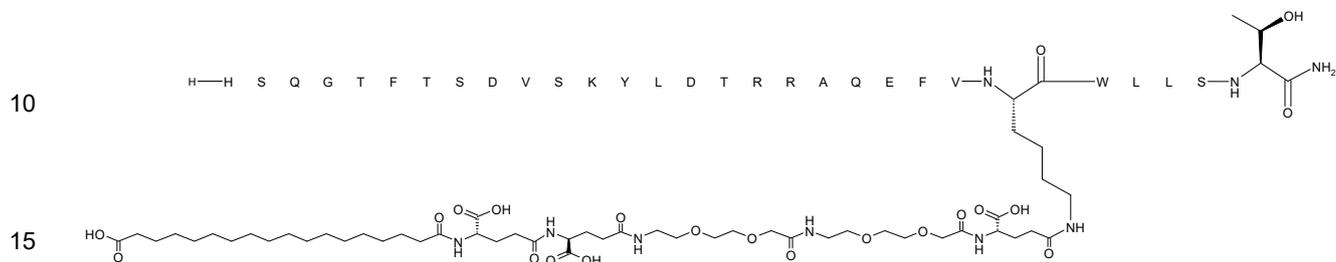
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,2 min

60 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1489; m/4 = 1117; m/5 = 894

Ejemplo 61

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Val10,Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

5 Sustancia química 61:



Método de UPLC: 04_A9_1; Rt= 16,1 min

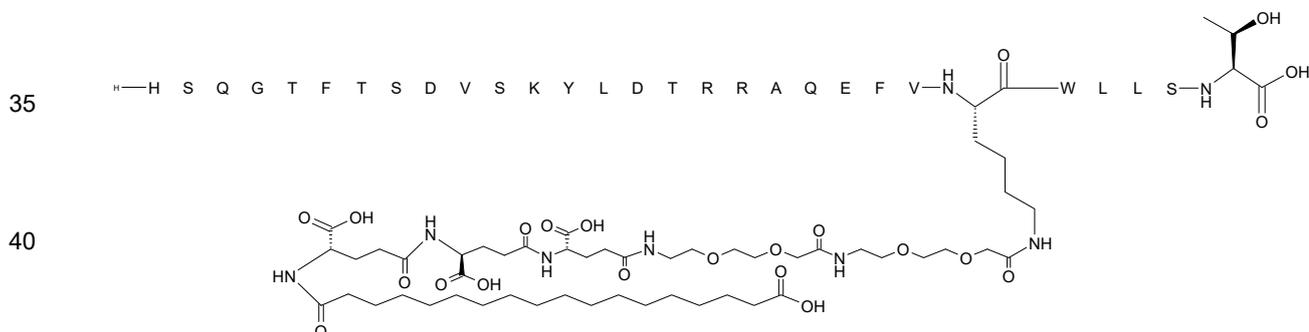
20 Método de UPLC: 10_B4_1; Rt= 9,6 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,5; m/3 =1459; m/4 = 1094; m/5 = 875

Ejemplo 62

25 N^ε₂₄-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Val10,Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

30 Sustancia química 62:



45 Método de UPLC: 05_B4_1: Rt=9,6 min

Método de LC-MS: LCMS_4; Rt=2,5 min; m/3= 1459; m/4= 1095; m/5= 876

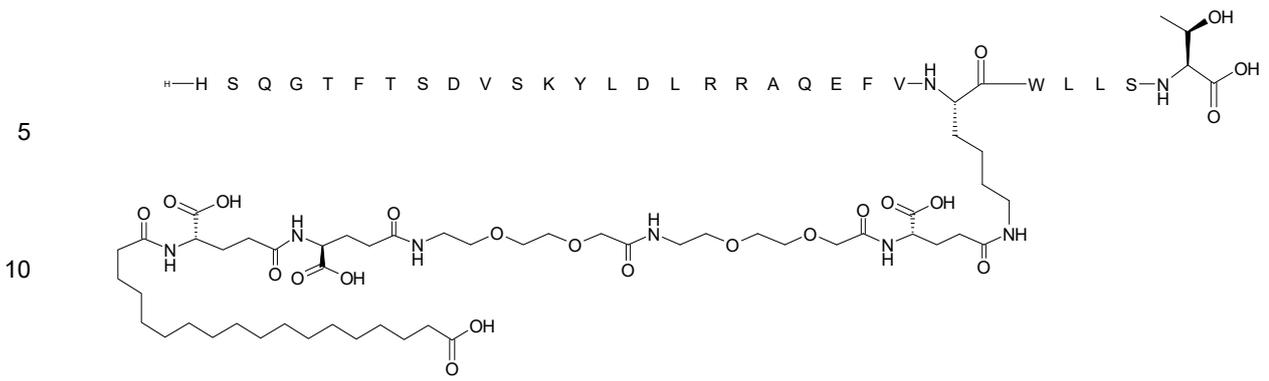
Ejemplo 63

50 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Val10,Leu16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

55 Sustancia química 63:

60

65



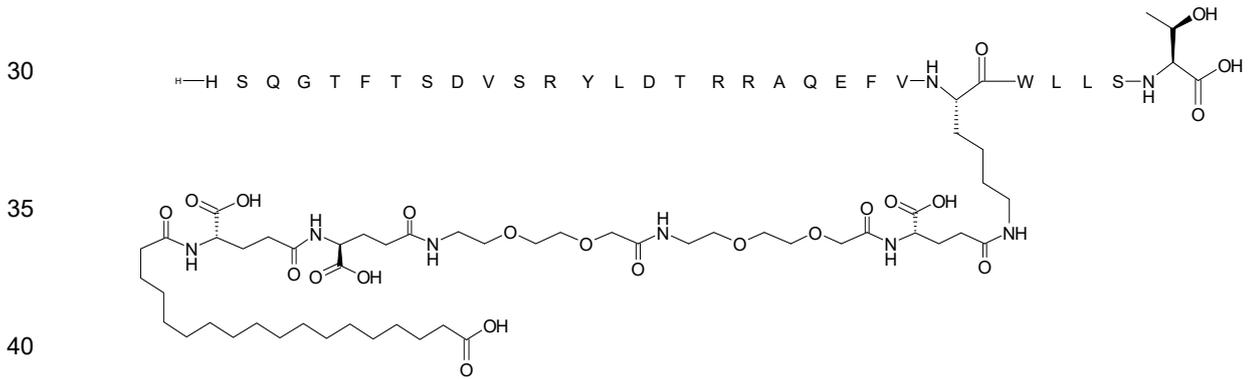
Método de UPLC: 05_B4_1: Rt=8,6 min

Método de LC-MS: LCMS_4; Rt=2,6 m/3=1463; m/4= 1098; m/5= 878

Ejemplo 64

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Val10,Arg12,Thr16,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 64:



Método de UPLC: 05_B4_1: Rt=9,7 min

Método de LC-MS: LCMS_4; RT=2,5 min; m/3= 1468; m/4= 1101; m/5= 881

Ejemplo 65

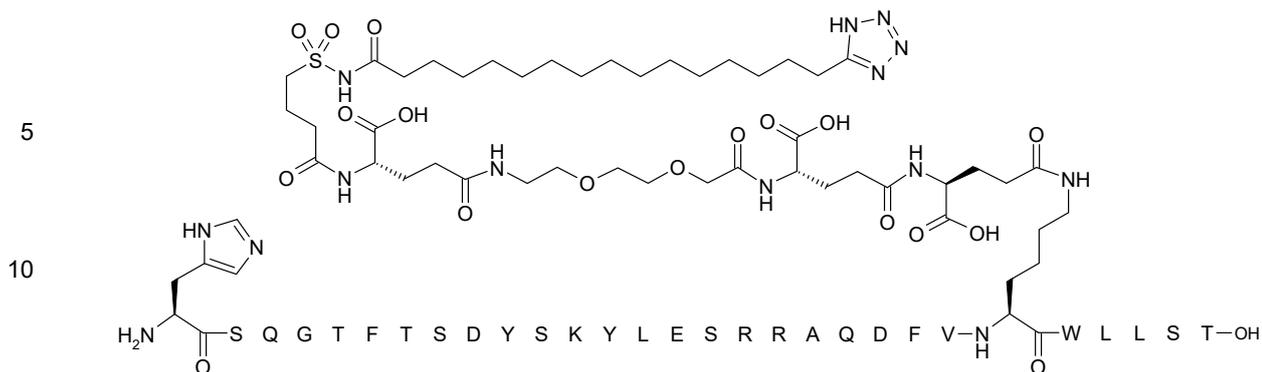
N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[4-[16-(1H-tetrazol-5-yl)hexadecanoylsulfamoyl]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 65:

55

60

65



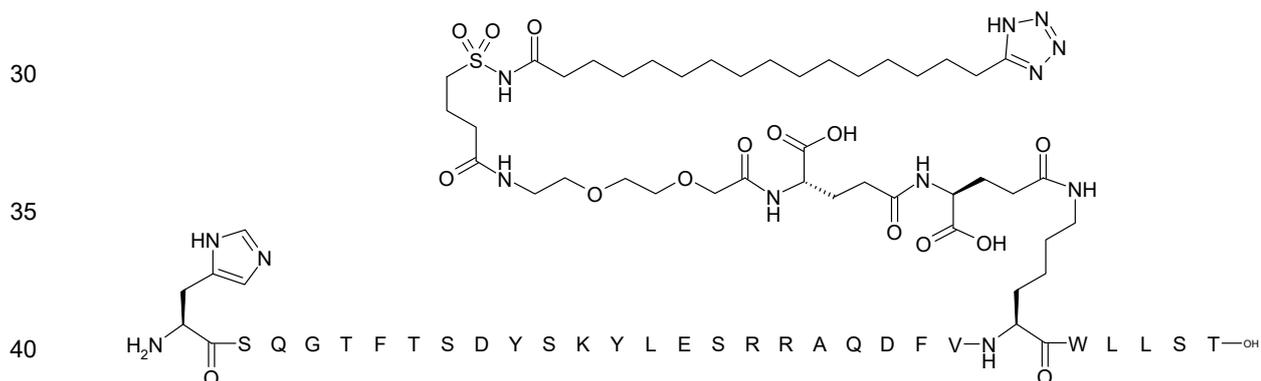
15 Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,1 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1481; m/4 = 1111

20 Ejemplo 66

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[4-[16-(1H-tetrazol-5-yl)hexadecanoylsulfamoyl]butanoylamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

25 Sustancia química 66:



Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,2 min

45 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1437

Ejemplo 67

50 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[4-[16-(1H-tetrazol-5-yl)hexadecanoylsulfamoyl]butanoylamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 67:

55

60

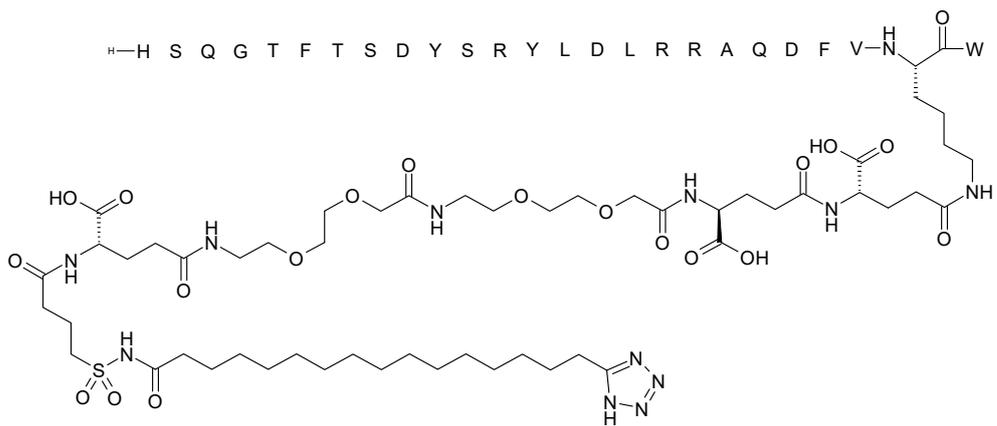
65



5

10

15



Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,5 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1542; m/4 = 1157

20

Ejemplo 68

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[4-[16-(1H-tetrazol-5-yl)hexadecanoylsulfamoyl]butanoylamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

25

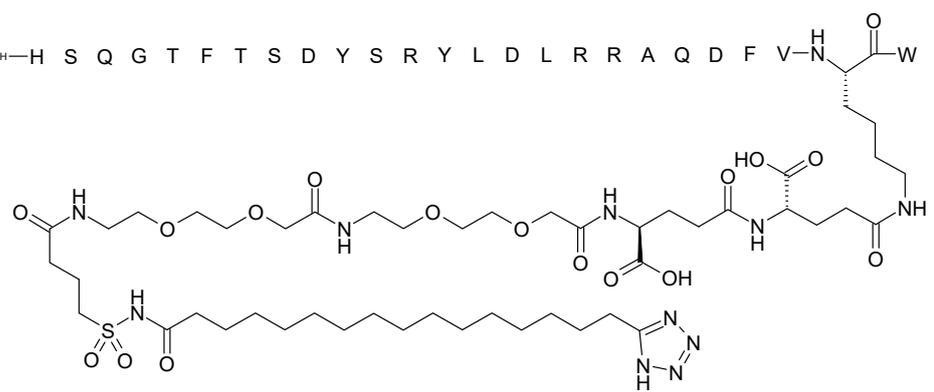
Sustancia química 68:



30

35

40



Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,6 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1499; m/4 = 1124

45

Ejemplo 69

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu15,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

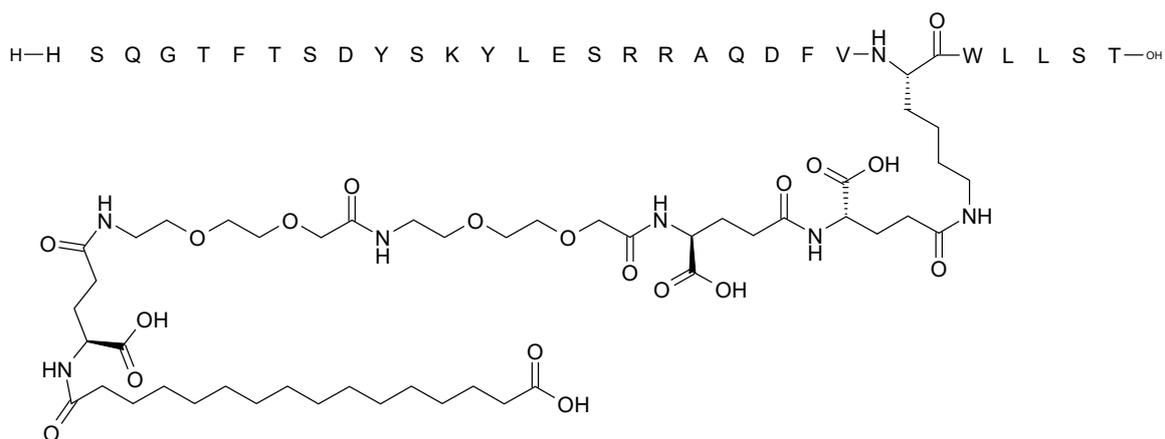
50

Sustancia química 69:

55

60

65



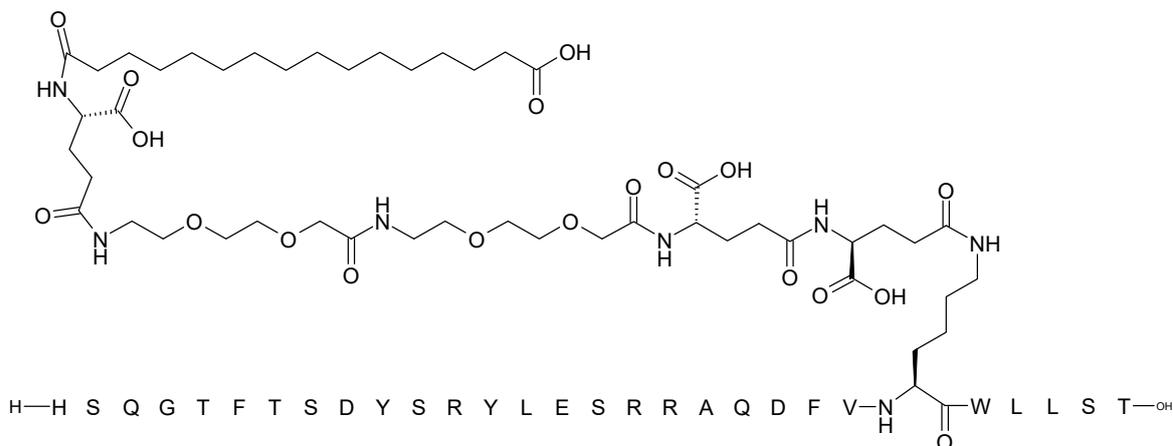
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1467; m/4 = 1100

Ejemplo 70

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Glu15,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 70:



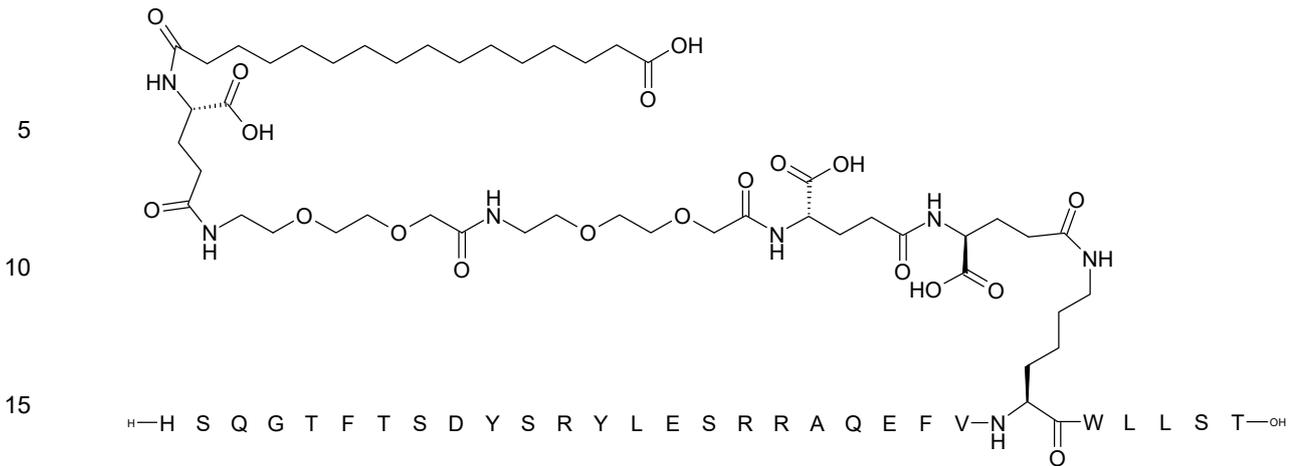
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107

Ejemplo 71

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Glu15,Glu21,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 71:



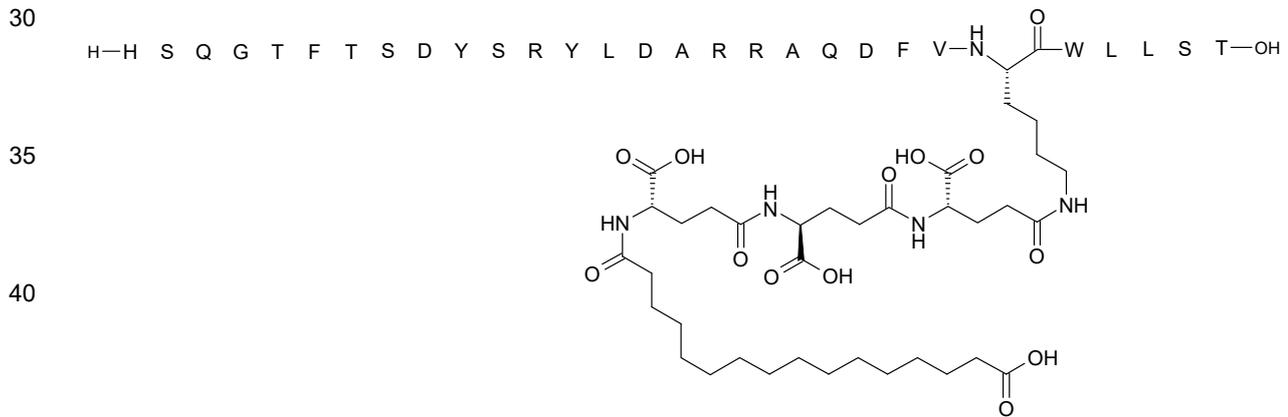
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,7 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1481

Ejemplo 72

25 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 72:



Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 7,9 min

Método de LCMS: LCMS_13: Rt = 2,2 min, m/3 = 1369; m/4 = 1027

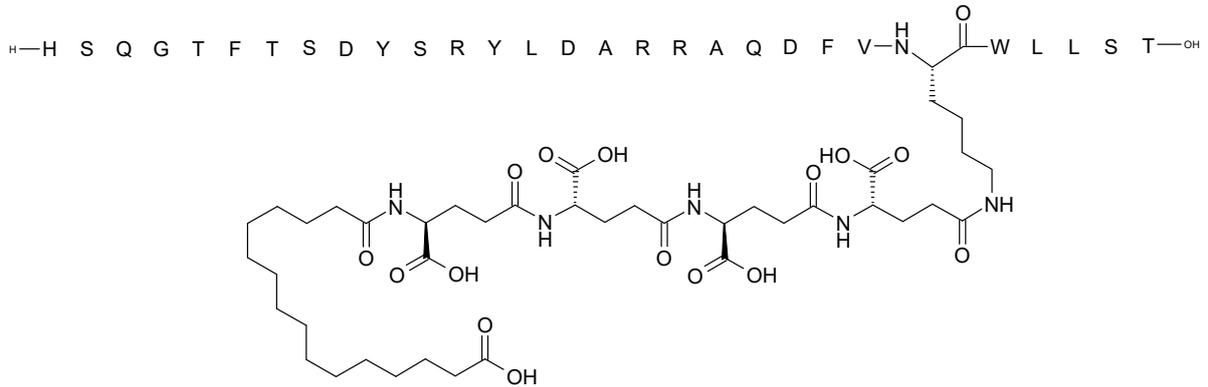
50 Ejemplo 73

55 N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 73:

60

65



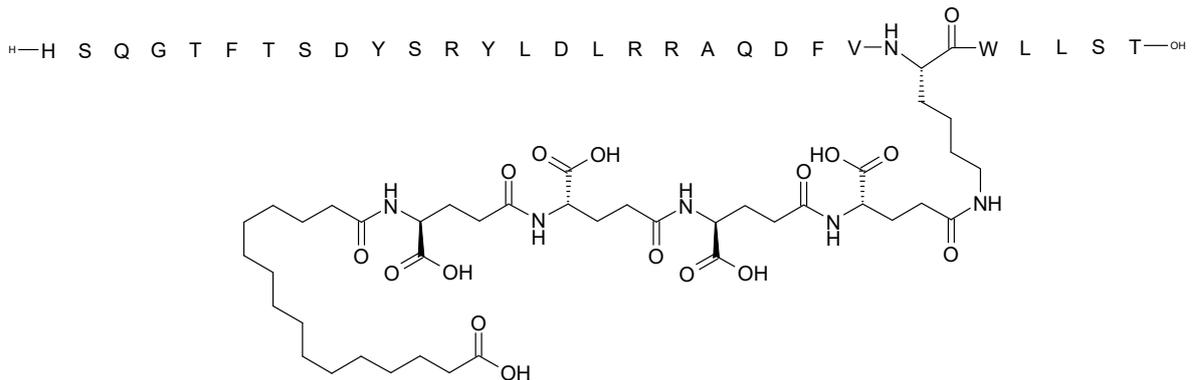
Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 7,9 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1412; m/4 = 1060; m/5 = 848

Ejemplo 74

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 74:



Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,1 min

Método de LCMS: LCMS_13: Rt = 2,2 min, m/3 = 1426; m/4 = 1070

Ejemplo 75

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ile16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

Sustancia química 75:



5

10

15

Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

20

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,2 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1426; m/4 = 1070; m/5 = 856

Ejemplo 76

25

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

30

Sustancia química 76:



35

40

45

Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,9 min

50

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,5 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 14,6 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1421; m/4 = 1066; m/5 = 853

55

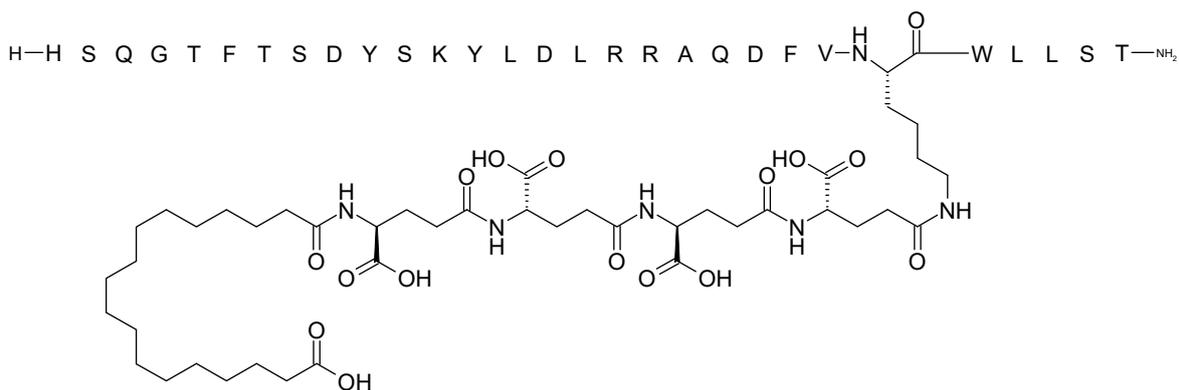
Ejemplo 77

60

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón amida

Sustancia química 77:

65



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

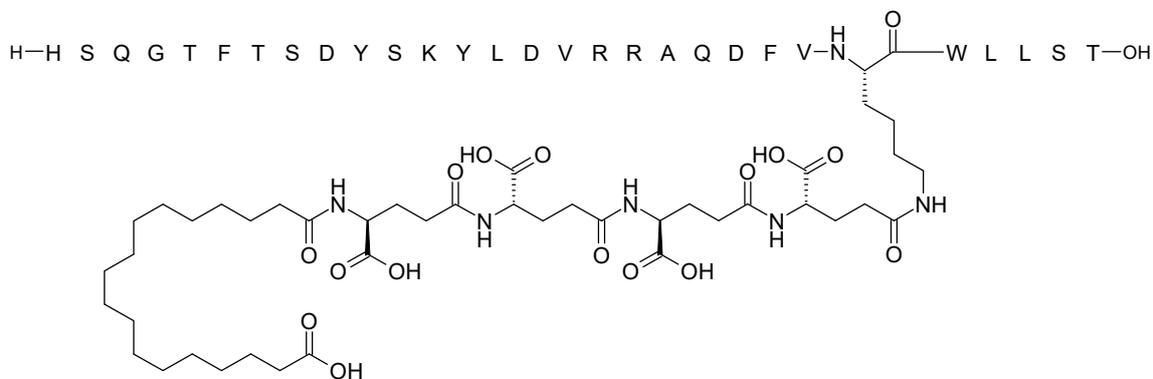
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,2 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1426; m/4 = 1070; m/5 = 856

Ejemplo 78

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 78:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,9 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,5 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,4 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1422; m/4 = 1066; m/5 = 853

Ejemplo 79

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ile16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

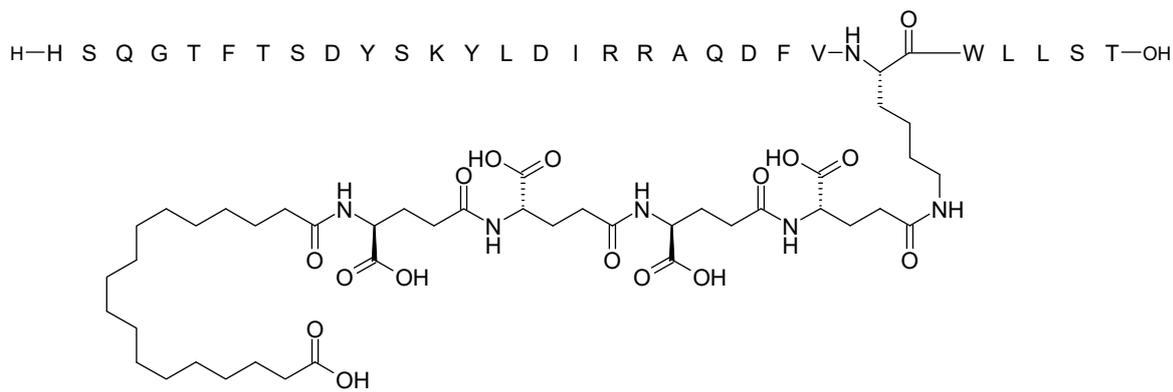
Sustancia química 79:



5

10

15



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

20 Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 13,1 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1426; m/4 = 1070; m/5 = 856

Ejemplo 80

25

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

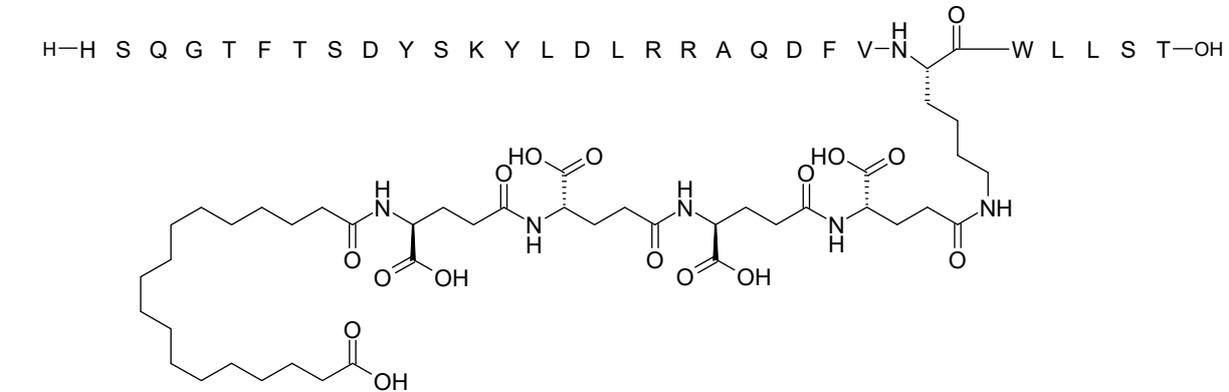
30 Sustancia química 80:



35

40

45



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,1 min

50

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 13,0 min

55 Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,3 min, m/3 = 1426; m/4 = 1070; m/5 = 856

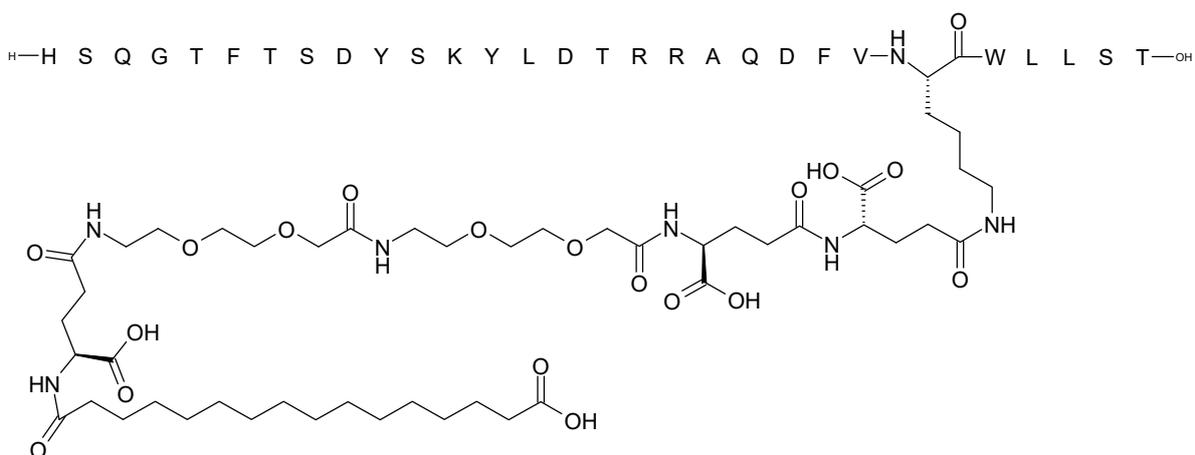
Ejemplo 81

60

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Thr16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 81:

65



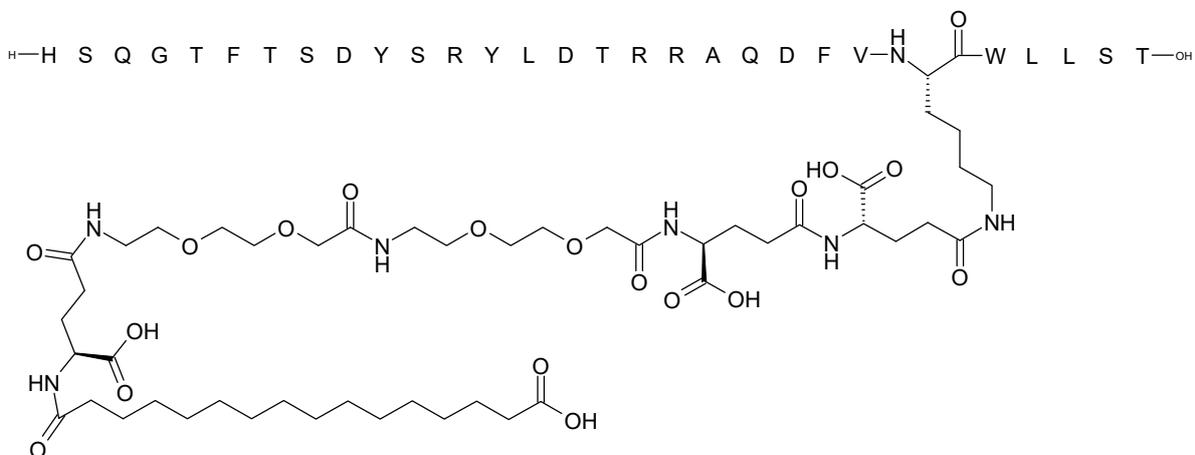
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1466

Ejemplo 82

25 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Thr16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 82:



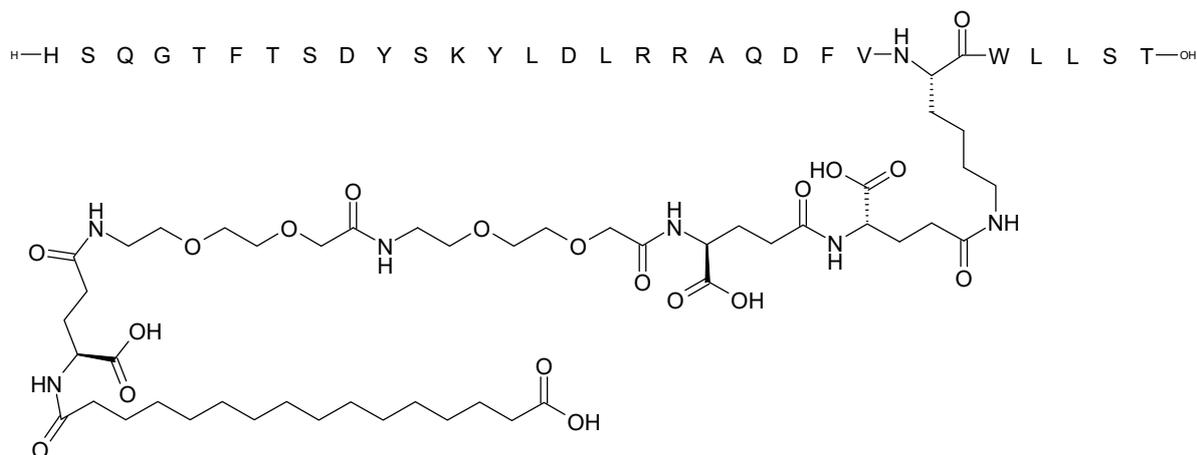
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 11,8 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1476

Ejemplo 83

55 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 83:



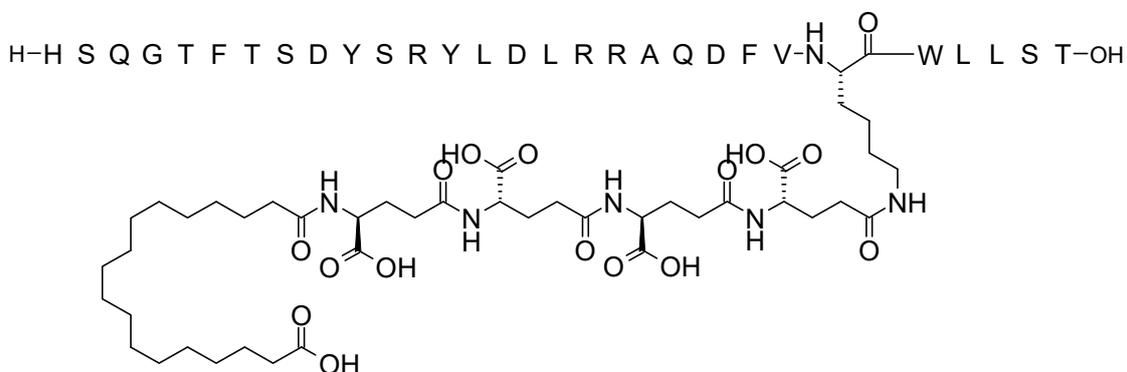
Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 12,2 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,4 min, m/3 = 1471; m/4 = 1103

Ejemplo 86

25 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 86:



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

50 Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,4 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,6 min, m/3 = 1436; m/4 = 1077; m/5 = 862

Ejemplo 87

55 N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ala28]-Glucagón

Sustancia química 87:

65

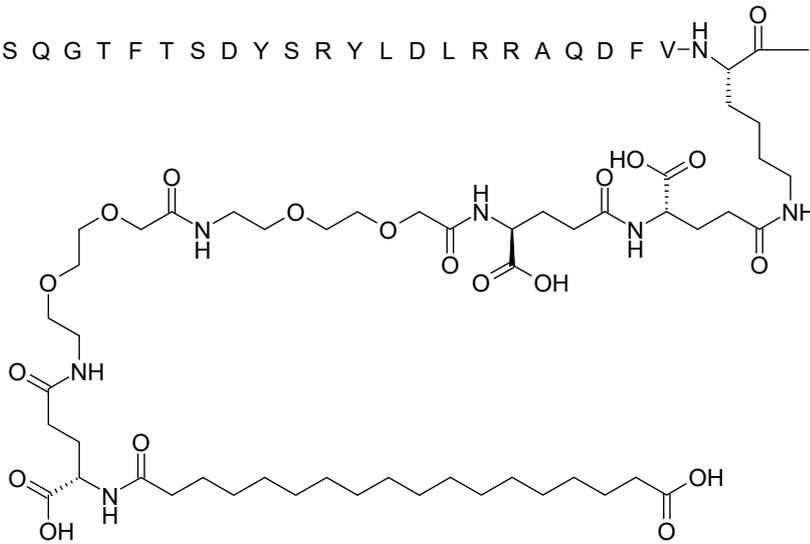


5

10

15

20



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,9 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,5 min

25

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 15,5 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,6 min, m/3 = 1484; m/4 = 1113; m/5 = 891

30 Ejemplo 88

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Gly28]-Glucagón

35

Sustancia química 88:



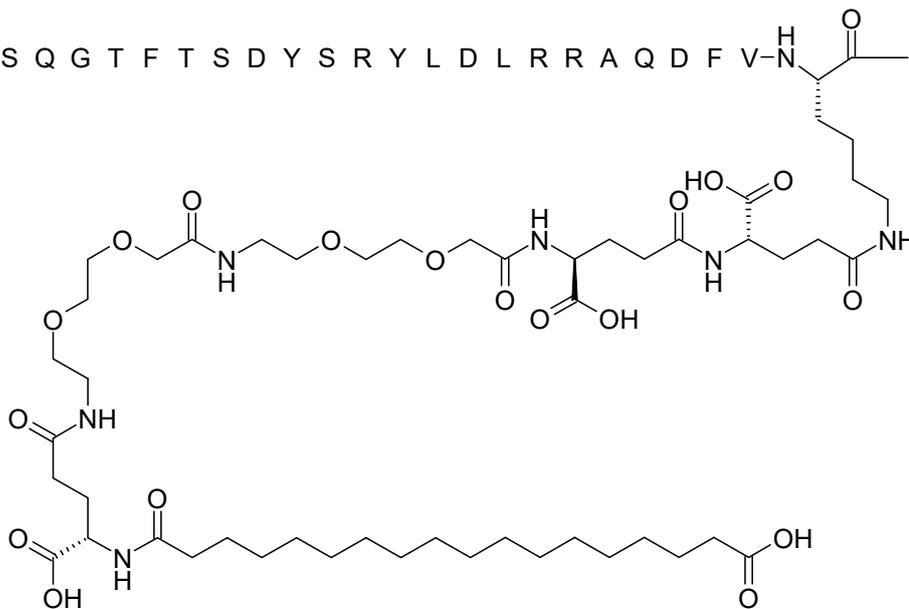
40

45

50

55

60



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 13,0 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,6 min

65

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 16,0 min

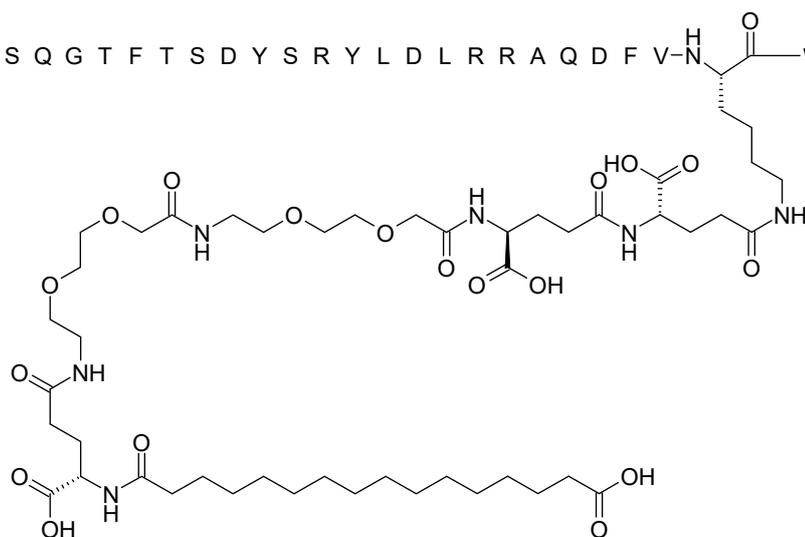


5

10

15

20



Método de UPLC: 08_B2_1: Rt = 12,3 min

Método de UPLC: 08_B4_1: Rt = 8,1 min

25

Método de UPLC: 04_A3_1: Rt = 14,9 min

Método de LCMS: LCMS_4: Rt = 2,5 min, m/3 = 1470; m/4 = 1103; m/5 = 882

30 Ejemplo 91

N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

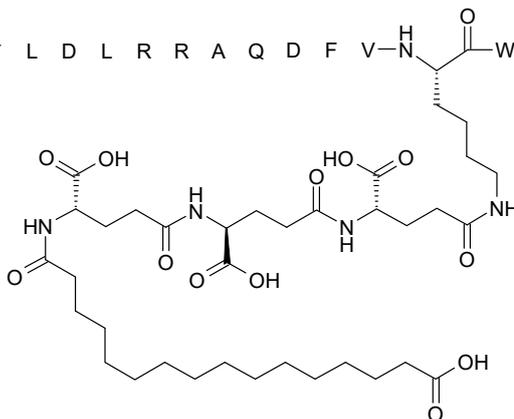
35 Sustancia química 91:



40

45

50



Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,2 min

55

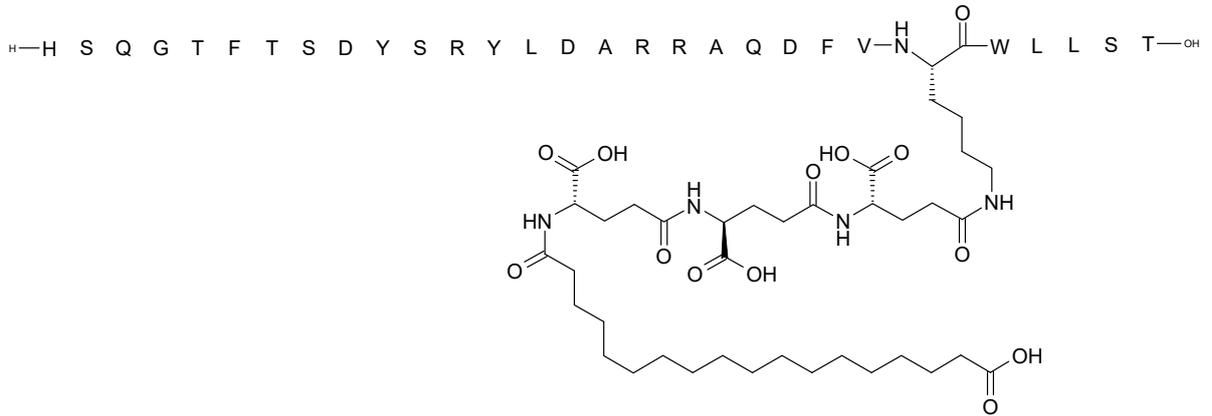
Método de LCMS: LCMS_13: Rt = 2,2 min, m/3 = 1383; m/4 = 1038

Ejemplo 92

60 N^{E24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 92:

65



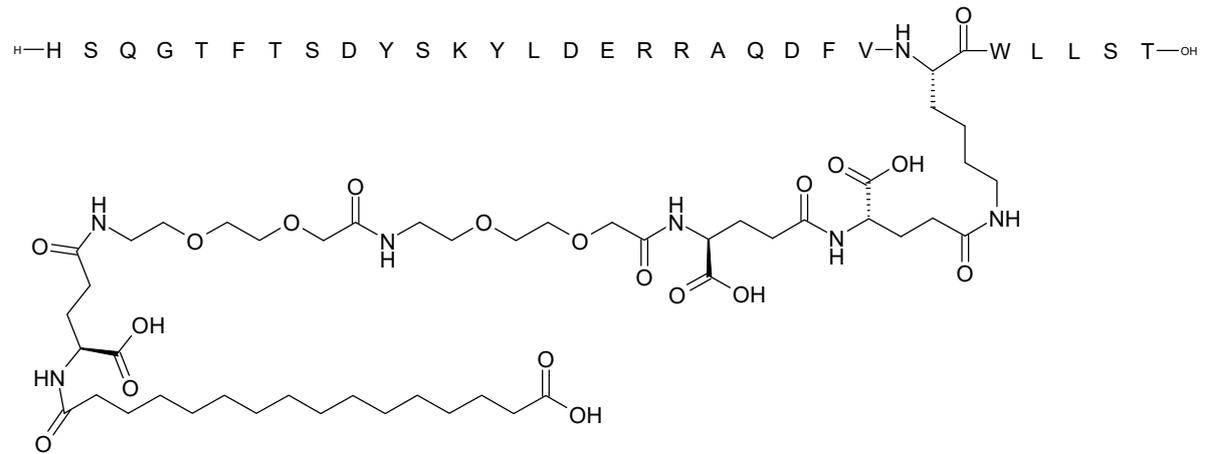
Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,5 min

Método de LCMS: LCMS_13: Rt = 2,3 min, m/3 = 1379; m/4 = 1034

Ejemplo 93

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Glu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 93:



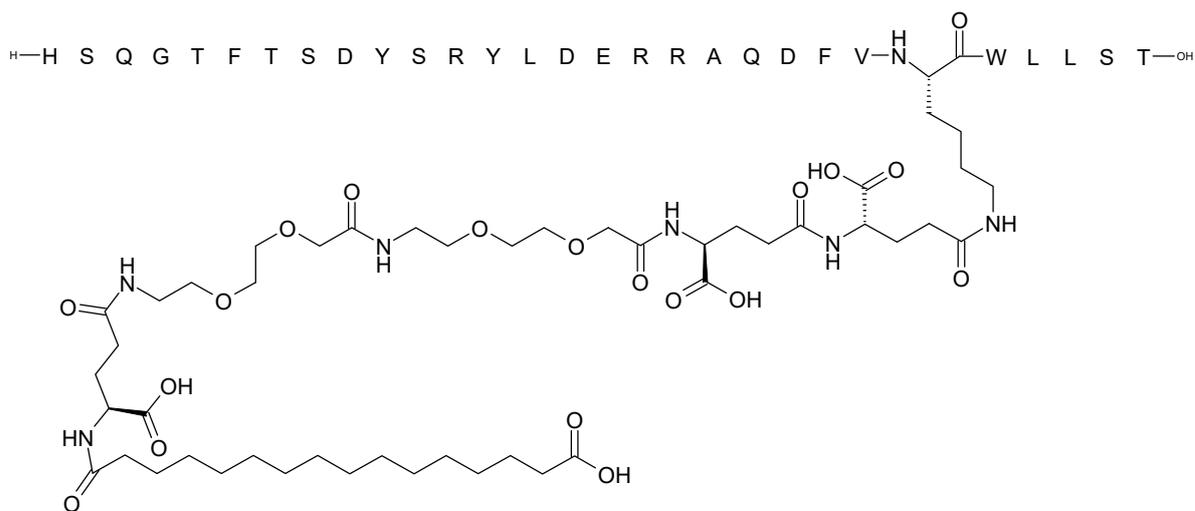
Método de UPLC: AP_B4_1: Rt = 7,8 min

Método de LCMS: LCMS_AP: Rt = 5,1 min, m/3 = 1476; m/4 = 1107

Ejemplo 94

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Glu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 94:



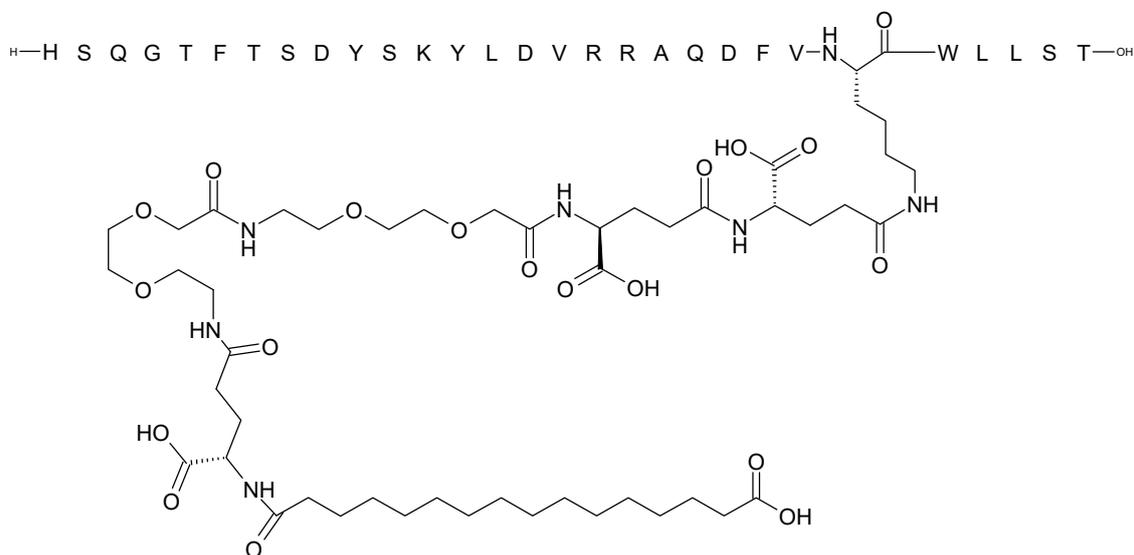
Método de UPLC: AP_B4_1: Rt = 7,8 min

Método de LCMS: LCMS_AP: Rt = 5,3 min, m/3 = 1485; m/4 = 1116

25 Ejemplo 95

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Val16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

30 Sustancia química 95:



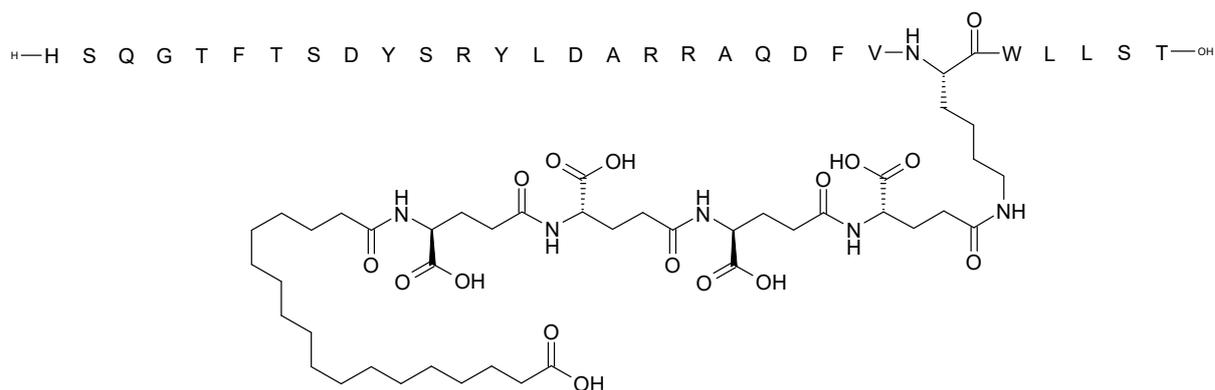
55 Método de UPLC: AP_B4_1: Rt = 8,0 min

Método de LCMS: LCMS_AP: Rt = 5,2 min, m/3 = 1466; m/4 = 1100

60 Ejemplo 96

N^{ε24}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoylamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ala16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

65 Sustancia química 96:



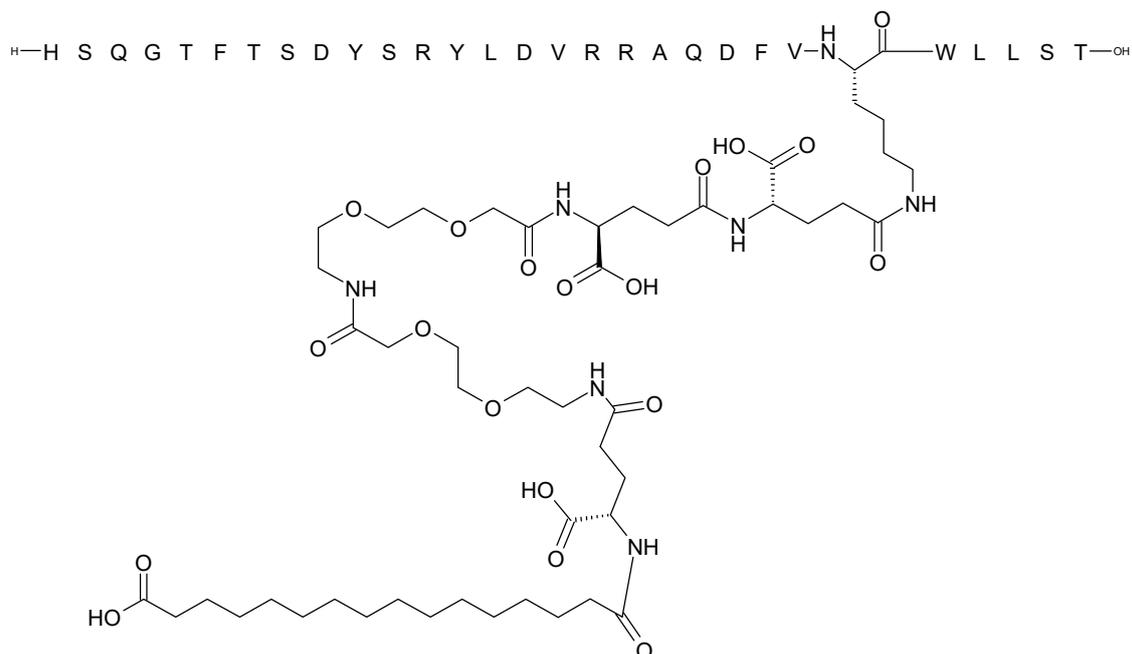
Método de UPLC: 09_B4_1: Rt = 8,4 min

Método de LCMS: LCMS_13: Rt = 2,3 min, m/3 = 1422; m/4 = 1067

Ejemplo 97

N^ε₂₄-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxypentadecanoylamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Val16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón

Sustancia química 97:



Método de UPLC: AP_B4_1: Rt = 8,2 min

Método de LCMS: LCMS_AP: Rt = 5,2 min, m/3 = 1475; m/4 = 1106

MÉTODOS

Ensayo (I)

Actividad de glucagón

El receptor de glucagón se clonó en células HEK-293 que tienen un biosensor de AMPc unido a la membrana (ACTOne™). Las células (14 000 por pocillo) se incubaron (37 °C, CO₂ al 5 %) durante toda la noche en placas de 384 pocillos. Al día siguiente, las células se cargaron con un colorante sensible al calcio que solo se distribuyó en el citoplasma. Se añadió probenecid, un inhibidor del transportador de aniones orgánicos, para evitar que el colorante

salga de la célula. Se añadió un inhibidor de PDE para evitar que se degradara el AMPc formado. Las placas se colocaron en un FLIPRTETRA y se añadieron los análogos de glucagón. Los datos del punto final se recogieron después de 6 minutos. Un aumento en el AMPc intracelular fue proporcional a un aumento en las concentraciones de calcio en el citoplasma. Cuando el calcio se unió al colorante, se generó una señal de fluorescencia. Los valores de EC50 se calcularon en Prism5.

Ensayo (II)

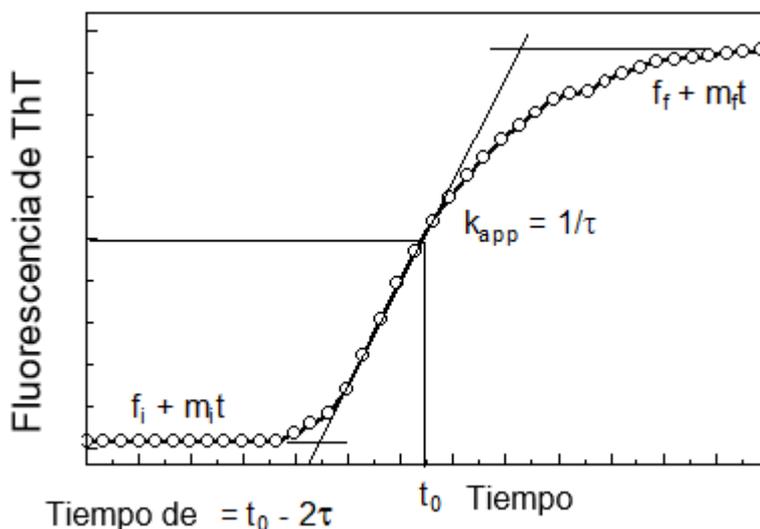
Ensayos de fibrilación con ThT para la evaluación de la estabilidad física de las formulaciones de péptidos

La estabilidad física baja de un péptido puede conducir a la formación de fibrillas de amiloide, que se observa como estructuras macromoleculares similares a hilo en la muestra, bien ordenadas, que eventualmente resultan en la formación de gel. Esto se ha medido tradicionalmente mediante inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medición es muy subjetiva y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda indicadora de molécula pequeña es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda de este tipo y tiene una firma de fluorescencia distinta cuando se une a las fibrillas [Naiki y otros (1989) Anal. BioChem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284].

El curso temporal para la formación de fibrillas puede describirse mediante una curva sigmoidea con la siguiente expresión [Nielsen y otros (2001) BioChemistry 40, 6036-6046]:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Ec.(1)}$$

Aquí, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante t0 es el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrillas son el tiempo de retraso calculado mediante t0 - 2τ y la constante de la tasa aparente kapp 1/τ.



La formación de un intermediario parcialmente plegado del péptido se sugiere como un mecanismo de iniciación general para la fibrilación. Algunos de esos intermediarios se nuclean para formar una plantilla sobre la cual los intermediarios posteriores pueden ensamblarse y se procede a la fibrilación. El tiempo de retraso corresponde al intervalo en el cual se construye la masa crítica de núcleos y la constante de tasa aparente es la tasa con la que se forma la propia fibrilla.

Las muestras se prepararon poco antes de cada ensayo. Cada composición de muestra se describe en las leyendas. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado mediante el uso de las cantidades apropiadas de NaOH y HCl concentrados. La tioflavina T se añadió a las muestras a partir de una solución madre en H2O a una concentración final de 1 M.

Las alícuotas de muestra de 200 µl se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Usualmente, se colocaron cuatro u ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

5 La incubación a una temperatura dada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizó en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo LabSystems). La temperatura se ajustó al valor deseado, típicamente 30 °C o 37 °C. La placa se incubó sin agitación (sin estrés físico externo) o con agitación orbital ajustada a 960 rpm con una amplitud de 1 mm. La medición de la fluorescencia se realizó mediante el uso de excitación a través de un filtro de 444 nm y la medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm.

10 Cada ejecución se inició mediante la incubación de la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos por un período de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describió.

15 Después de completar el ensayo con ThT, las cuatro u ocho réplicas de cada muestra se agruparon y se centrifugaron a 20 000 rpm durante 30 minutos a 18 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se transfirió una alícuota a un vial de HPLC.

20 La concentración del péptido en la muestra inicial y en el sobrenadante filtrado se determinó por HPLC de fase inversa mediante el uso de un estándar apropiado como referencia. La fracción porcentual de la concentración de la muestra filtrada constituida de la concentración de la muestra inicial se informó como la recuperación.

25 Los puntos de medición se guardaron en formato de Microsoft Excel para el procesamiento posterior y el dibujo y el ajuste de curvas se realizó mediante el uso de GraphPad Prism. La emisión de fondo a partir de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son típicamente una media de cuatro u ocho muestras y se muestran con barras de error de la desviación estándar. Solo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir las muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico asegurando una medida de formación de fibrillas relativa entre los experimentos.

30 El conjunto de datos puede ajustarse a la Ec. (1). Sin embargo, el tiempo de retraso antes de la fibrilación puede evaluarse mediante inspección visual de la curva que identifica el punto temporal en el cual la fluorescencia de ThT aumenta significativamente por encima del nivel de fondo.

35 Tabla 1. *Datos in vitro* sobre la unión al receptor, el tiempo de retraso del ensayo con ThT y la recuperación a pH 7,5 y la estabilidad química a pH 8,15

Compuesto	Ensayo(I) Glucagón [EC50] (nM)	Ensayo ThT [Tiempo de retraso] (h)	Ensayo ThT [Recuperación] (%)	Estabilidad química [Pérdida de pureza/14 días 37C] (%)
40 Ejemplo 1	0,28	45	100	7,6
Ejemplo 2	0,129	45	100	n.d.
Ejemplo 3	0,249	45	100	n.d.
Ejemplo 4	0,237	45	96	7,5
Ejemplo 5	0,105	45	100	n.d.
45 Ejemplo 6	0,077	45	100	n.d.
Ejemplo 7	0,081	29	100	n.d.
Ejemplo 8	0,081	40	100	n.d.
Ejemplo 9	0,036	45	98	10
Ejemplo 10	0,031	45	96	10,3
50 Ejemplo 11	0,084	4,3	21	6,2
Ejemplo 12	0,075	45	100	7,0
Ejemplo 13	0,136	45	100	5,1
Ejemplo 14	0,748	45	100	8,6
55 Ejemplo 15	0,255	23	96	5,3
Ejemplo 16	0,158	45	100	n.d.
Ejemplo 17	1,642	12	58	3,1
Ejemplo 18	1,666	0	87	n.d.
Ejemplo 19	0,754	8	88	4,3
60 Ejemplo 20	0,355	45	100	10,4
Ejemplo 21	1,324	6,3	9	2,9
Ejemplo 22	0,297	45	97	8,8
Ejemplo 23	1,038	10	11	3,1
Ejemplo 24	0,006	26,9	81	n.d.
65 Ejemplo 25	0,067	45	100	n.d.

ES 2 767 705 T3

	Ejemplo 26	1,070	8	57	n.d.
	Ejemplo 27	0,910	3	13	n.d.
	Ejemplo 28	0,100	2	12	n.d.
5	Ejemplo 29	1,323	37	96	2,8
	Ejemplo 30	0,307	5,3	17	n.d.
	Ejemplo 31	0,072	45	100	n.d.
	Ejemplo 32	1,121	45	100	n.d.
	Ejemplo 33	0,920	45	100	n.d.
10	Ejemplo 34	1,895	45	100	n.d.
	Ejemplo 35	0,413	45	100	n.d.
	Ejemplo 36	0,120	39	100	n.d.
	Ejemplo 37	0,183	44	100	n.d.
	Ejemplo 38	0,139	45	100	4,2
15	Ejemplo 39	0,039	45	100	7,8
	Ejemplo 40	0,078	45	100	7,5
	Ejemplo 41	0,130	45	100	7,3
	Ejemplo 42	0,153	6	100	7,2
20	Ejemplo 43	0,049	19	100	7,6
	Ejemplo 44	0,176	45	100	10,5
	Ejemplo 45	0,243	14	100	3,3
	Ejemplo 46	0,095	7	8	n.d.
	Ejemplo 47	0,136	12	69	n.d.
25	Ejemplo 48	0,204	8,3	27	n.d.
	Ejemplo 49	0,169	45	100	6,8
	Ejemplo 50	0,118	45	100	4,8
	Ejemplo 51	0,148	45	100	5,7
	Ejemplo 52	0,289	45	100	6,3
30	Ejemplo 53	0,099	3,7	83	2,5
	Ejemplo 54	1,629	n.d.	n.d.	n.d.
	Ejemplo 55	1,090	n.d.	n.d.	n.d.
	Ejemplo 56	0,192	45	100	8,1
35	Ejemplo 57	0,070	3,3	65	7,9
	Ejemplo 58	0,134	8	100	7,3
	Ejemplo 59	0,682	n.d.	n.d.	n.d.
	Ejemplo 60	0,517	n.d.	n.d.	n.d.
	Ejemplo 61	0,156	45	100	6,2
40	Ejemplo 62	0,080	45	89	5,6
	Ejemplo 63	0,088	45	100	4,1
	Ejemplo 64	0,176	45	100	5,1
	Ejemplo 65	0,362	n.d.	n.d.	7,8
	Ejemplo 66	0,395	10,3	74	8,3
45	Ejemplo 67	0,231	n.d.	n.d.	7,4
	Ejemplo 68	0,357	13,7	26	5,6
	Ejemplo 69	0,071	45	96	8,2
	Ejemplo 70	0,140	21	88	7,6
50	Ejemplo 71	0,072	45	95	n.d.
	Ejemplo 72	0,016	7	81	6,1
	Ejemplo 73	0,106	0	29	n.d.
	Ejemplo 74	0,109	0	5	n.d.
	Ejemplo 75	0,402	45	100	3,6
55	Ejemplo 76	0,268	45	93	5,5
	Ejemplo 77	0,812	45	96	4,1
	Ejemplo 78	0,134	36,6	93	4,3
	Ejemplo 79	0,189	45	92	3,8
	Ejemplo 80	0,126	45	94	4,5
60	Ejemplo 81	0,017	45	96	n.d.
	Ejemplo 82	0,025	n.d.	n.d.	n.d.
	Ejemplo 83	0,016	45	96	10,3
	Ejemplo 84	0,022	45	96	10,7
	Ejemplo 85	0,039	45	100	7,4
65	Ejemplo 86	0,343	45	94	3,7
	Ejemplo 87	0,253	45	90	5,8

Ejemplo 89	0,064	45	93	6,8
Ejemplo 90	0,090	45	93	5,4
Ejemplo 91	0,027	6,3	5	n.d.
Ejemplo 92	0,066	13	53	6,5
Ejemplo 93	0,017	45	100	14
Ejemplo 94	0,029	45	100	8,8
Ejemplo 95	0,009	45	34	5,1
Ejemplo 96	0,062	45	100	4,5
Ejemplo 97	0,026	1	3	n.d.
n.d.: no determinado				

Tabla 2. Vida media de análogos de glucagón en minicerdos

Ejemplo	iv PK en minicerdo [T1/2] (h)
Ejemplo 13	76,4
Ejemplo 15	77,4
Ejemplo 16	86,6
Ejemplo 24	4,1
Ejemplo 25	59,6
Ejemplo 38	83,0
Ejemplo 63	63,7
Ejemplo 80	60,9

Ensayo (III)

Actividad de GLP-1

El receptor de GLP-1 se clona en células HEK-293 que tienen un biosensor de AMPc unido a LA membrana (ACTOne™). Las células (14 000 por pocillo) se incuban (37 °C, CO2 al 5 %) durante toda la noche en placas de 384 pocillos. Al día siguiente, las células se cargan con un colorante sensible al calcio que solo se distribuyó en el citoplasma. Se añade probenecid, un inhibidor del transportador de aniones orgánicos, para evitar que el colorante salga de la célula. Se añade un inhibidor de PDE para evitar que se degradara el AMPc formado. Las placas se colocan en un FLIPRTETRA y se añaden los análogos de glucagón. Los datos del punto final se recogen después de 6 minutos. Un aumento en el AMPc intracelular es proporcional a un aumento en las concentraciones de calcio en el citoplasma. Cuando el calcio se une al colorante, se genera una señal de fluorescencia. Los valores de EC50 se calculan en Prism5.

Ensayo (IV)

Ensayo de LOCI

Las muestras se analizan para determinar el péptido mediante el uso de un Inmunoensayo de Luminiscencia de Canalización de Oxígeno (LOCI). Las perlas donantes se recubren con estreptavidina, mientras que las perlasceptoras se conjugan con un anticuerpo monoclonal (1F120) específico para el glucagón. El otro anticuerpo monoclonal de unión a glucagón (2F7) se biotinila. Los tres reactivos se combinan con el analito y forman un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación del complejo liberó átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes. Se canalizan en las esferas receptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se mide en un lector de placas Envision. La cantidad de luz emitida es proporcional a la concentración del péptido.

Se aplica un µl de muestra/calibrador/control a los pocillos de placas LOCI de 384 pocillos seguido de una mezcla de 15 µl de las perlas receptoras recubiertas de anticuerpo (0,5 µg/pocillo) y el anticuerpo biotinilado. Las placas se incuban durante 1 hora a 21–22 °C. Después se añade 30 µl de las perlas donantes recubiertas con estreptavidina (2 µg/pocillo) a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a 21-22 °C. Las placas se leen en un lector de placas Envision a 21-22 °C con un filtro que tiene un ancho de banda de 520-645 nm después de la excitación mediante un láser de 680 nm. El tiempo de medición total por pocillo es de 210 ms, lo que incluye un tiempo de excitación de 70 ms.

Ensayo (V)

Pérdida de peso corporal en ratas obesas inducidas por la dieta

Sesenta y cuatro ratas Sprague Dawley alimentadas con alto contenido de grasa (Research Diet D12492) y ocho alimentadas con bajo contenido de grasa (Research Diet D12450B) se usan para este estudio. Las ratas deberían pesar aproximadamente 970 g y 730 g, respectivamente antes de la dosificación. Las ratas deben tener acceso ad

libitum al agua y ser alojadas individualmente para permitir el monitoreo diario de la ingesta de alimentos. Las luces se apagan de 10 a.m. a 10 p.m.

5 Las ratas se dividen en grupos de ocho y se dosifican por vía subcutánea (sc) una vez al día con dos sustancias de prueba durante 15 días, el volumen de dosis es de 0,5 ml/kg. Antes de iniciar la dosificación, las ratas se manejan diariamente y se entrenan para la dosificación sc. durante 5 días.

10 Al 5^o día de dosificación, las dosis del análogo de glucagón se ajustan de 30 nmol/kg a 3 nmol/kg y de 300 nmol/kg a 30 nmol/kg debido a la dramática curva de pérdida de peso experimentada en las ratas.

En el día 11, las ratas se someten a un perfil de glucosa en sangre. Las ratas terminan el día 15 o el día 16, y se toma una muestra de sangre para medir la insulina y el colesterol.

15 Ensayo (VI)

Protocolo experimental para probar la eficacia sobre el apetito con un derivado de glucagón, mediante el uso de un modelo de rata alimentada *ad libitum*

20 Se usan ratas Sprague Dawley (SD) de Taconic Europe, Dinamarca para los experimentos. Las ratas tienen un peso corporal de 200-250 g al comienzo del experimento. Las ratas llegan 14 días antes del inicio del experimento para permitir la aclimatación a los entornos experimentales. Durante este período, los animales son manipulados dos veces. Después de la llegada, las ratas se alojan individualmente durante una semana en una fase de luz/oscuridad invertida (lo que significa que las luces están apagadas durante el día y encendidas durante la noche) durante dos semanas. Dado que las ratas normalmente son activas y comen la mayor parte de su ingesta diaria de alimentos durante el período oscuro, las ratas se dosifican por la mañana justo antes de que se apaguen las luces. Esta configuración resulta en la variación de datos más baja y la sensibilidad de prueba más alta. El experimento se lleva a cabo en las jaulas caseras de las ratas y las ratas tienen acceso libre a alimentos y agua durante todo el período de aclimatación y el período del experimento. Cada dosis de derivado se prueba en un grupo de 5 ratas. Se incluye un grupo de vehículo de 6-7 ratas en cada conjunto de pruebas. Las ratas se dosifican una vez de acuerdo con el peso corporal con una solución de 0,01-3 mg/kg administrada por vía subcutánea (sc.). Después de la dosificación, las ratas son devueltas a sus jaulas caseras, donde tienen acceso a comida y agua. El consumo de alimentos se registra individualmente de manera continua mediante el registro en línea o manualmente cada hora durante 7 horas, y luego después de 24 h y nuevamente después de 48 h. Al final de la sesión experimental, los animales se sacrifican.

35 Los datos individuales se registran en hojas de Excel de Microsoft. Los valores atípicos se excluyen después de aplicar la prueba de evaluación estadística de Grubbs para valores atípicos. Los datos se informan como ingesta acumulada de alimentos en función del tiempo. Se hacen comparaciones entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba mediante el uso la prueba t de Student o ANOVA de una vía.

40 Ensayo (VII)

Ensayo de estabilidad frente a la DPP-IV

45 Se incuban 10 μ M del péptido con DPP-IV (2 μ g/ml) por duplicado a 37 °C en un tampón HEPES al cual se añade Tween20 al 0,005 %. En el experimento, el GLP-1 humano se usa como un control positivo. Las alícuotas de muestra se toman a los 3, 15, 30, 60, 120 y 240 min y se añaden tres volúmenes de etanol para detener la reacción. Las muestras se analizan por LC-MS para determinar el péptido parental. Los datos se representan de acuerdo con una cinética de 1^{er} orden y la estabilidad se informa como vidas medias.

50 Ensayo (VIII)

Perfil PK

55 Quince ratas macho (Sprague Dawley, 400 g, Taconic Europe) se dividen en tres grupos de cinco ratas. Las ratas se dosifican a t = 0 con 15 nmol/kg IV, 30 nmol/kg SC o 100 nmol/kg, respectivamente. La dosificación IV se realiza a través de la vena de la cola mientras que las ratas se sometieron a anestesia con isoflurano. Las muestras de sangre se obtienen a través de la vena sublingual a los tiempos t = -15 min, 5 min (solo ratas con dosis IV), 15 min, 30 min, 1 h, 1½ h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h. Las muestras de plasma se almacenan en congelación hasta que se analizan mediante el Ensayo IV.

60 Ensayo (IX)

Solubilidad dependiente del pH

65

La solubilidad de péptidos y proteínas depende del pH de la solución. A menudo, una proteína o péptido precipita en o cerca de su punto isoeléctrico (pI), en el cual su carga neta es cero. A un pH bajo (es decir, menor del pI) los péptidos y proteínas típicamente se cargan positivamente, a un pH mayor que el pI, se cargan negativamente.

- 5 Es ventajoso para un péptido terapéutico si es soluble en una concentración suficiente a un pH determinado, que es adecuado tanto para formular un producto farmacéutico estable como para administrar el producto farmacéutico al paciente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea.

10 Las curvas de solubilidad frente a pH se miden como se describe: se prepara una formulación o solución de péptido en agua y las alícuotas se ajustan a valores de pH en el intervalo deseado mediante la adición de HCl y NaOH. Estas muestras se dejan equilibrar a temperatura ambiente durante 2 – 4 días. Después, las muestras se centrifugan. Se extrae una pequeña alícuota de cada muestra para el análisis de HPLC inversa para determinar la concentración de las proteínas en solución. El pH de cada muestra se mide después de la centrifugación, y se representa la concentración de cada proteína frente al pH medido.

15 Ensayo (X)

Evaluación de la estabilidad química

20 La estabilidad química de los análogos de glucagón se investigó mediante la separación por RP-UPLC y la detección UV. Las muestras liofilizadas se disolvieron en tampón (ver a continuación las composiciones detalladas) a una concentración final de 333 µM y un pH de 8,15, y se incubaron durante 14 días a 5 °C y 37 °C seguido de un análisis RP-UPLC. La pureza se definió como el porcentaje de área del pico principal en relación con el área total de todos los picos integrados en cada cromatograma. La pérdida de pureza después de 14 días a 37 °C se determinó como la diferencia en pureza entre las muestras incubadas a 5 °C y 37 °C, dividido por la pureza de la muestra después de la incubación durante 14 días a 5 °C.

25 El análisis por RP-UPLC se realizó mediante el uso de una columna Waters BEH130 2,1 mm x 150 mm, 1,7 µm operada a 50 °C y una tasa de flujo de 0,4 ml/min mediante el uso de un sistema de fase móvil que consiste típicamente en A: 50mM Fosfato, Acetonitrilo al 10 % peso/peso, pH 3 y B: Acetonitrilo al 80 % v/v. La detección UV se realizó a 215 nm. El perfil de gradiente típico usado para la mayoría de las muestras se muestra más abajo.

35

Tiempo/min	B
Inyección	20
30	50
31	99
32	99
34	20
35	20
40	20

40

45 Para algunos análogos individuales que eluyen en tiempos de retención diferentes sustancialmente en comparación con la mayoría de los análogos, se realizaron algunos ajustes al perfil de gradiente para permitir una mejor comparación de la evaluación de pureza en las muestras. Además, la composición del componente de la fase móvil del canal B se cambió en algunos de los análisis por una solución de solvente de acetonitrilo al 90 % v/v en un intento de manejar mejor la transferencia del material de una inyección a la siguiente en la secuencia. Sin embargo, esto se compensó al recalcular el perfil del gradiente de manera adecuada.

50 Tampón:

55 50 mM de dinatriumfosfatodihidrato
184 mM de propilenglicol
58 mM de fenol
el pH se ajustó a 8,15 con H₃PO₄. En los casos en que el pH se ajustó a 8,15 después de la resuspensión de los análogos, se usó NaOH 0,2 M.

60 Ensayo (XI)

Estudio farmacocinético en minicerdos

El propósito de este estudio es determinar las propiedades farmacocinéticas in vivo de los derivados de glucagón después de la administración i.v. a minicerdos. Esto se hizo en un estudio farmacocinético (PK), donde se determina,

entre otros parámetros, la vida media terminal y la eliminación del derivado en cuestión. El aumento de la vida media terminal y la disminución de la eliminación significa que el compuesto de estudio se elimina de manera más lenta del cuerpo. Para los análogos de glucagón esto implica una duración extendida del efecto farmacológico.

5 En los estudios se usaron minicerdos hembras o machos de Göttingen obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmose, 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).
10 En algunos estudios, después de al menos 2 semanas de aclimatación, se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis o cranialis en cada animal. A los animales se les permitió recuperarse durante 1 semana después de la cirugía, y después se usaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un periodo de reposo farmacológico adecuado entre las dosificaciones sucesivas del derivado de glucagón. En otros estudios los animales se aclimatan durante 1 semana, después de lo cual se usaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de reposo farmacológico adecuado entre las administraciones de dosis sucesivas de los derivados de glucagón.
15 En cada momento de administración de la dosis, a estos cerdos se les colocó un catéter intravenoso periférico en una vena de la oreja a través del cual se dosifican los derivados. El muestreo de sangre se realizó por venopunción en la v. jugularis o en la v. cava cranialis

20 Los animales se mantuvieron en ayuno durante aproximadamente 18 h o sin ayuno antes de la administración de la dosis y de 0 a 4 h después de la administración de la dosis, pero tuvieron acceso a voluntad al agua durante todo el período.

25 Los derivados de glucagón se disolvieron usualmente en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración de usualmente de 20-60 nmol/ml. Se administraron inyecciones intravenosas (el volumen que corresponde a usualmente 2-3 nmol/kg, por ejemplo, 0,1 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter o a través del catéter intravenoso periférico, y se tomaron muestras de sangre en puntos temporales predefinidos hasta 13 días después de la administración de la dosis (preferentemente, a través del otro catéter o por venopunción). Las muestras de sangre (por ejemplo, 0,8 ml) se recolectaron en tubos con tampón EDTA (8 mM) (a veces se añadió aprotinina 500 KIU/ml de sangre) y después se centrifugan a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos. El plasma se pipeteó en tubos Micronic sobre hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta que se analizó la concentración plasmática del derivado de glucagón respectivo utilizando un ensayo cuantitativo apropiado como ELISA o LC-MS.
30 Sobre la base de estas mediciones, se trazan los perfiles de concentración de plasma en el tiempo para el compuesto de estudio y se realiza un denominado análisis farmacocinético no compartimental de los datos en WinNonlin v. 5.0 o Phoenix v. 6.2 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.) u otro software relevante para el análisis PK. Para la mayoría de los compuestos, la parte terminal de los perfiles de concentración plasmática será lineal cuando se dibuje en una gráfica semilogarítmica, lo que refleja que después de la absorción inicial y la distribución, el fármaco se elimina del cuerpo a una tasa fraccional constante. La tasa (λ_Z o λ_z) es igual a menos la pendiente de la parte terminal del gráfico. A partir de esta tasa, puede calcularse, además, la vida media plasmática, como $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda_z$ (ver, por ejemplo, Johan Gabrielsson y Daniel Weiner: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications, 3ra Ed., Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo (2000)). La eliminación se define como la dosis (D) dividida por el área bajo la curva (AUC) sobre el perfil de concentración plasmática frente al tiempo (Rowland, M y Tozer TN: Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, 3ra edición, 1995 Williams Wilkins)

45 Ensayo (XII)

Efecto de los análogos de glucagón sobre el peso corporal en ratas con obesidad inducida por la dieta (DIO)

50 El propósito de este ensayo es evaluar el efecto de los análogos de glucagón sobre el peso corporal en ratas con obesidad inducida por la dieta (DIO).

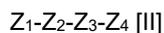
En resumen, las ratas se alimentaron con una dieta alta en grasas durante 10 semanas y obtuvieron pesos corporales de aproximadamente 600 g. A las ratas DIO se les administró después una dosis subcutánea diaria de un análogo de glucagón durante tres semanas. El peso corporal se midió cada día en relación con la dosificación.

55 Las ratas macho Sprague Dawley, Taconic (Dinamarca), con un peso de aproximadamente 325 g a la llegada, se alojaron tres por jaula y se les proporcionó acceso ad libitum a una dieta alta en grasas (Research Diets, R12492, 60 % de calorías de grasa) y agua. Después de 4 semanas con la dieta alta en grasas, los animales se asignaron al azar para alojar dos por jaula y después de otra semana, se inició un estudio de una semana con la dosificación subcutánea diaria de análogos de glucagón. Posteriormente, los animales recibieron cuatro semanas de lavado antes de que se iniciara el presente estudio. Después del período de lavado, los animales se dividieron aleatoriamente en 16 grupos de 6 ratas y un grupo de 10 ratas que constituían el grupo de vehículo. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas durante todo el período.

65 El análogo de glucagón se disolvió en 50 mM de Na₂HPO₄, 145 mM de NaCl o Tween al 0,05 % y las ratas DIO recibieron una dosis subcutánea diaria de un análogo de glucagón durante tres semanas (4 en punto de la tarde) como 0,5 ml/kg. El peso corporal se midió diariamente en relación con la dosificación.

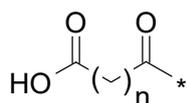
REIVINDICACIONES

1. Un péptido de glucagón que comprende:
- la SEQ ID 1, en donde X_{24} es Lys y en donde al menos una de las siguientes sustituciones está presentes: X_{15} es Glu o X_{16} es Ala, Ile, Phe, Arg, Thr, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr, y hasta seis sustituciones de aminoácidos adicionales están presentes en dicho péptido de glucagón y
 - un sustituyente que comprende tres o más restos cargados negativamente, en donde uno de dichos restos cargados negativamente es distal de un resto lipofílico y donde el sustituyente se une al nitrógeno de la cadena lateral de Lys en la posición 24,
- o una sal, éster, amida o ácido farmacéuticamente aceptable de este.
2. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X_{16} es Ile, Phe, Arg, Val, Leu, Glu, Trp o Tyr.
3. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde X_{16} es Ile, Val, Leu o Phe.
4. El péptido de glucagón de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde dichas sustituciones de aminoácidos adicionales se pueden seleccionar de las siguientes posiciones de dicho péptido de glucagón:
- X_{10} es Val,
 - X_{12} es Arg,
 - X_{17} es Lys,
 - X_{20} es Lys,
 - X_{21} es Glu,
 - X_{27} es Leu,
 - X_{28} es Ser, Ile, Gly o Thr, y
 - X_{29} es Val, Leu o Ile.
5. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho sustituyente tiene la fórmula II:

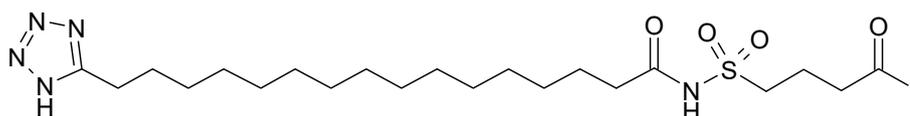


en donde,

Z_1 representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIa o IIb;



IIa



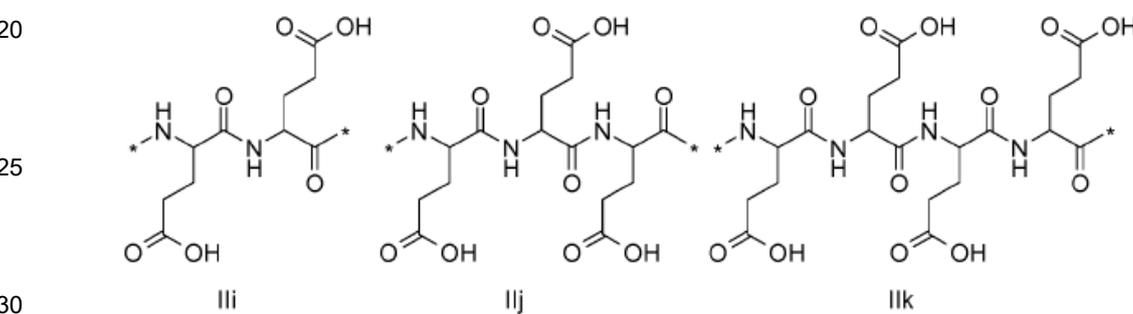
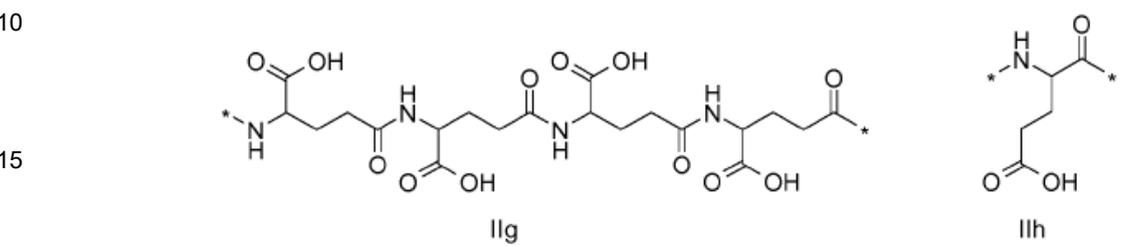
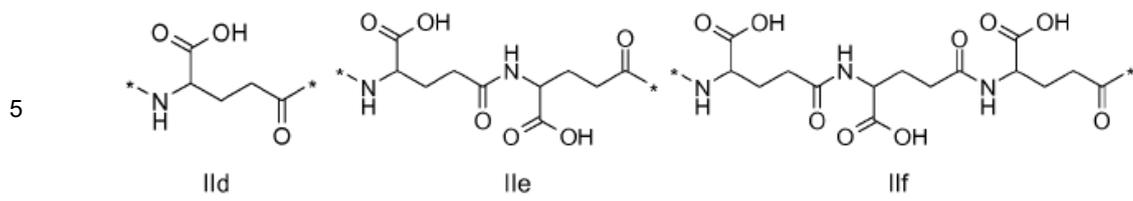
IIb

en donde n en la Fórmula IIa es 6-20,

el símbolo * en las fórmulas IIa y IIb representa el punto de unión al nitrógeno en Z_2 ;

si Z_2 está ausente, Z_1 se une al nitrógeno en Z_3 en el símbolo * y si Z_2 y Z_3 están ausentes Z_1 se une al nitrógeno en Z_4 en el símbolo *

Z_2 está ausente o representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIc, IIe, IIg, IIh, Ili, IIj o IIk;

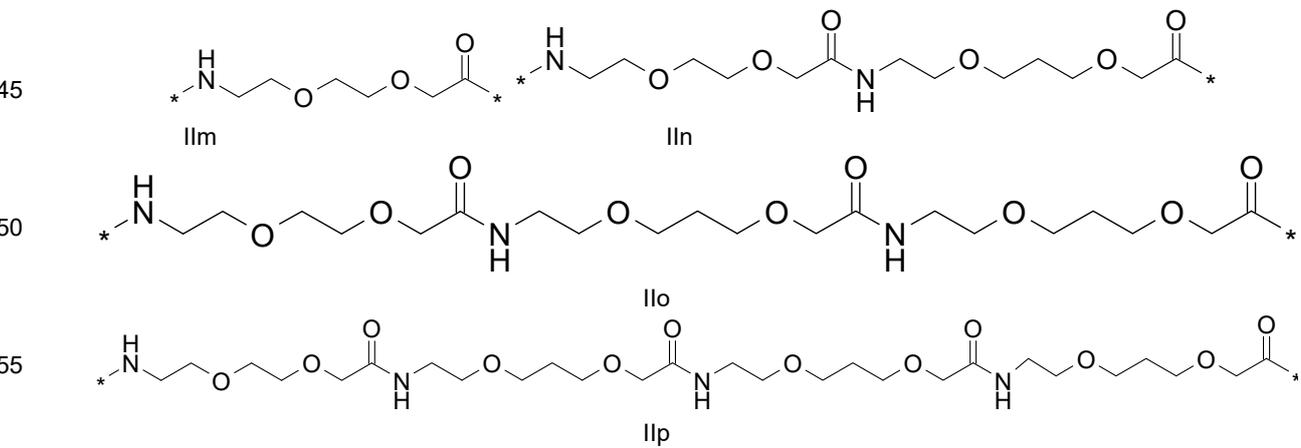


en donde cada resto de aminoácido tiene independientemente la estereoquímica L o D;

en donde Z2 se conecta a través del átomo de carbono indicado * al nitrógeno de Z3 indicado *;

si Z3 está ausente, Z2 se conecta a través del átomo de carbono indicado * al nitrógeno de Z4 indicado * y si Z3 y Z4 están ausentes Z2 se conecta a través del carbono indicado * al nitrógeno épsilon de Lys en la posición 24 del péptido de glucagón;

Z3 está ausente o representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIIm, IIIn, IIo o IIp;

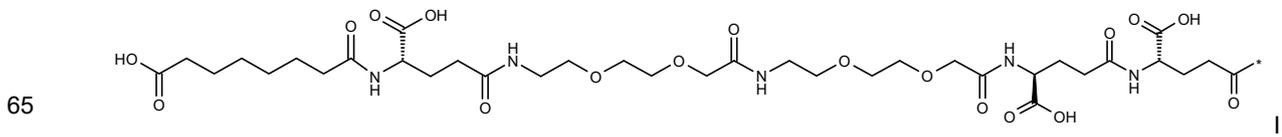
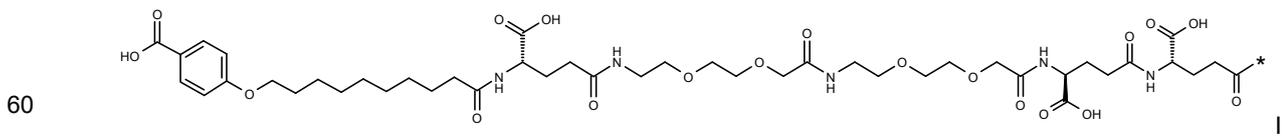
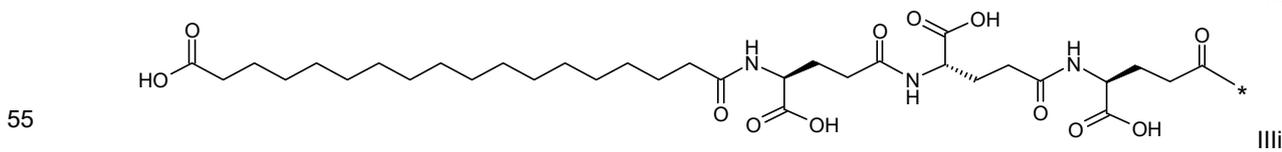
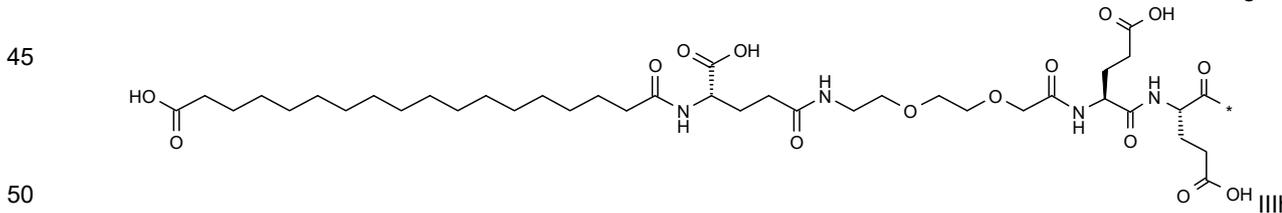
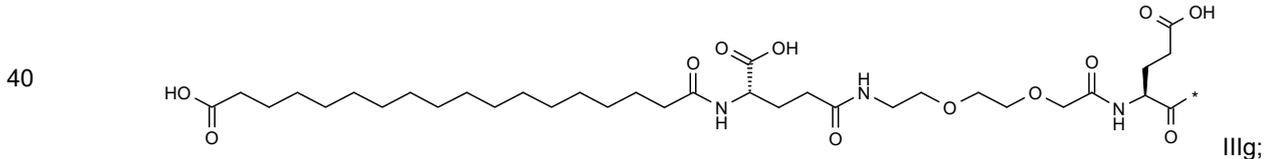
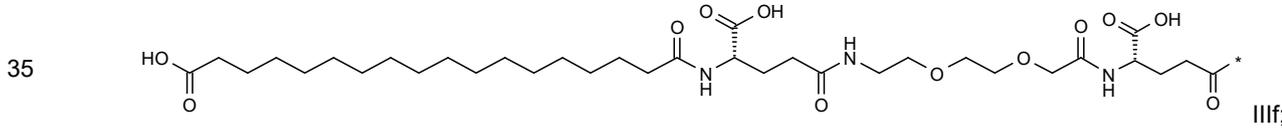
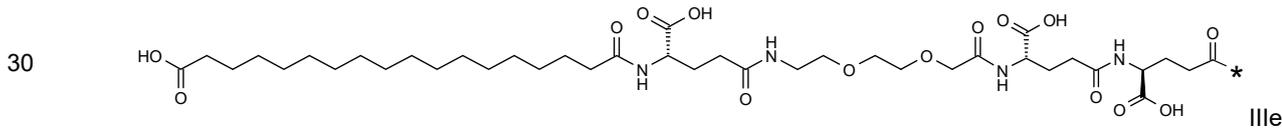
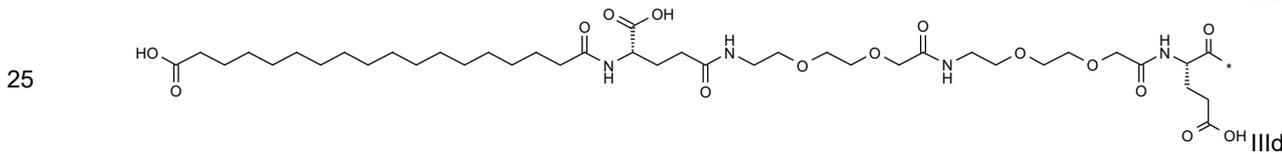
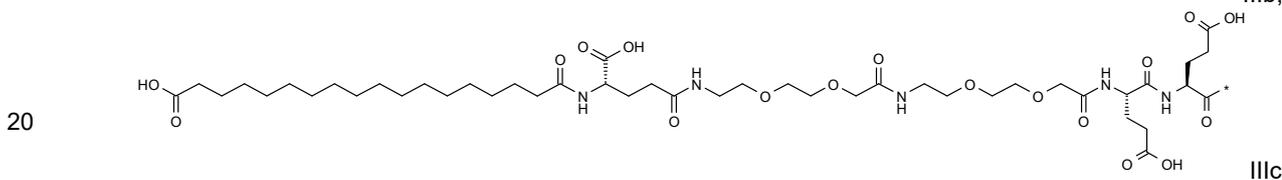
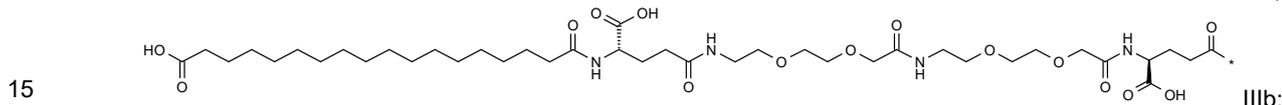
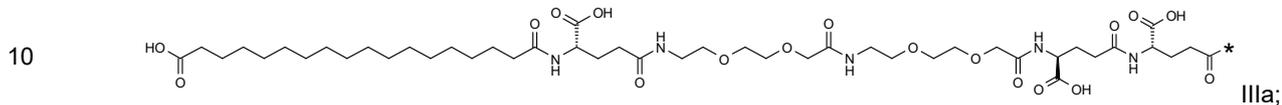


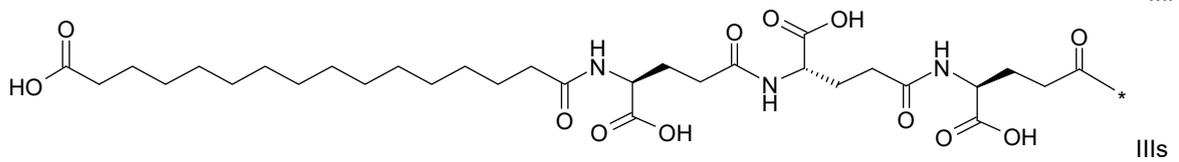
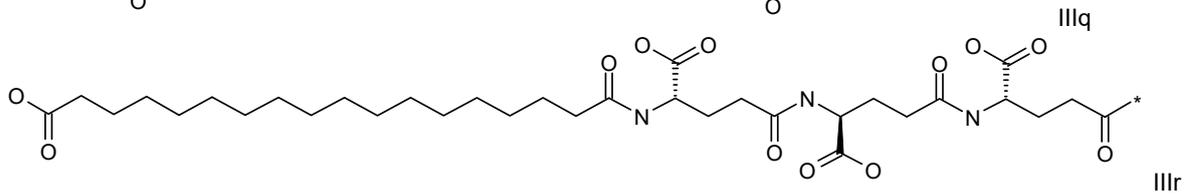
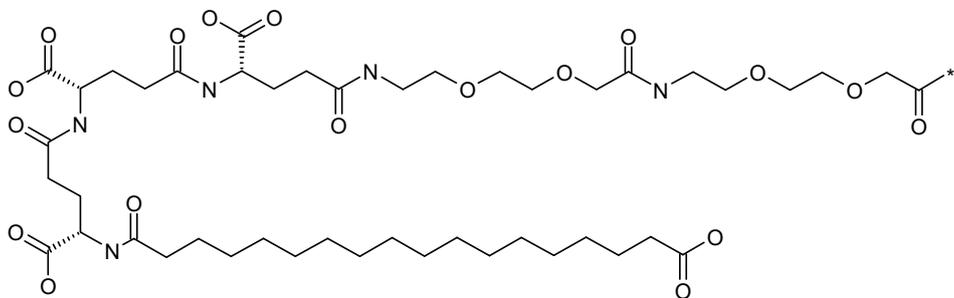
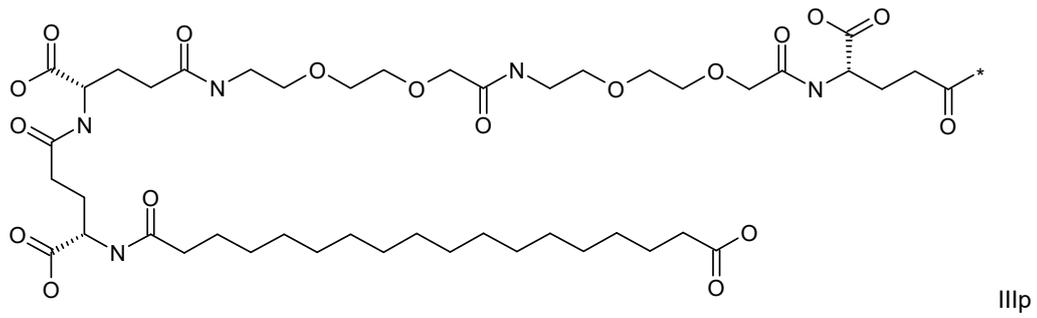
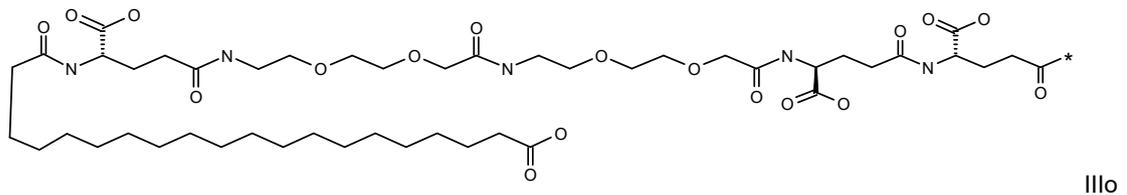
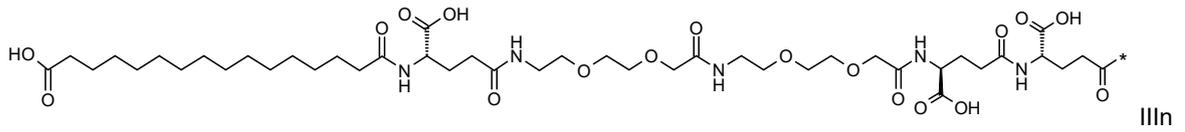
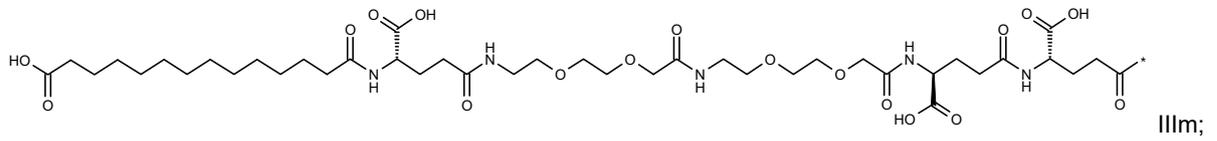
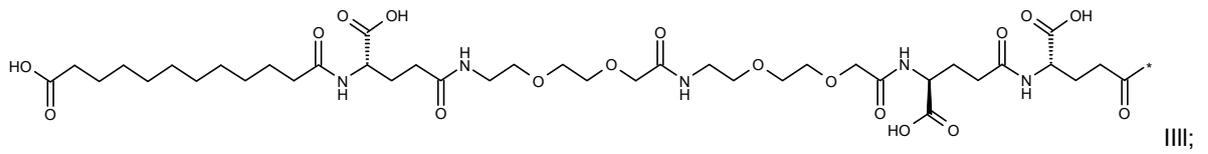
Z3 se conecta a través del carbono de Z3 con símbolo * al nitrógeno de Z4 con símbolo *, si Z4 está ausente Z3 se conecta a través del carbono con el símbolo * al nitrógeno épsilon de Lys en la posición 24 del péptido de glucagón

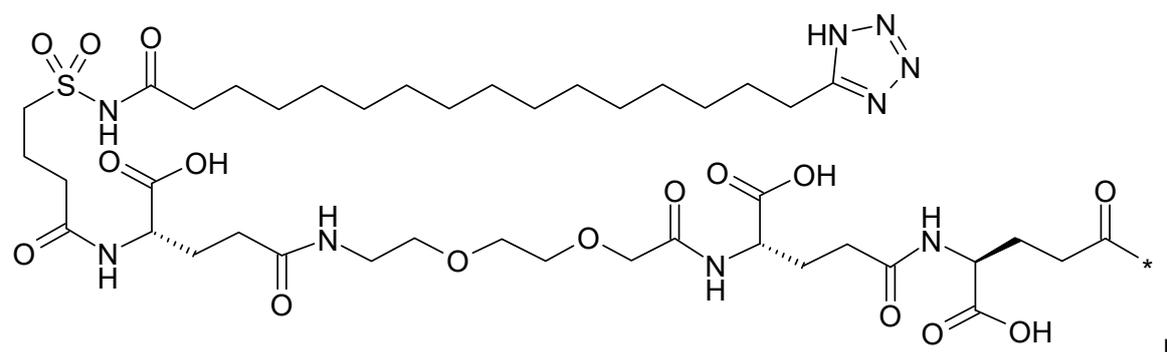
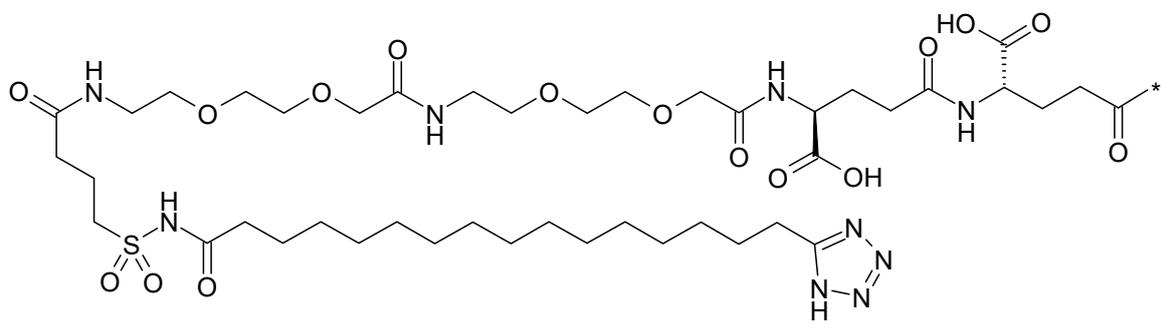
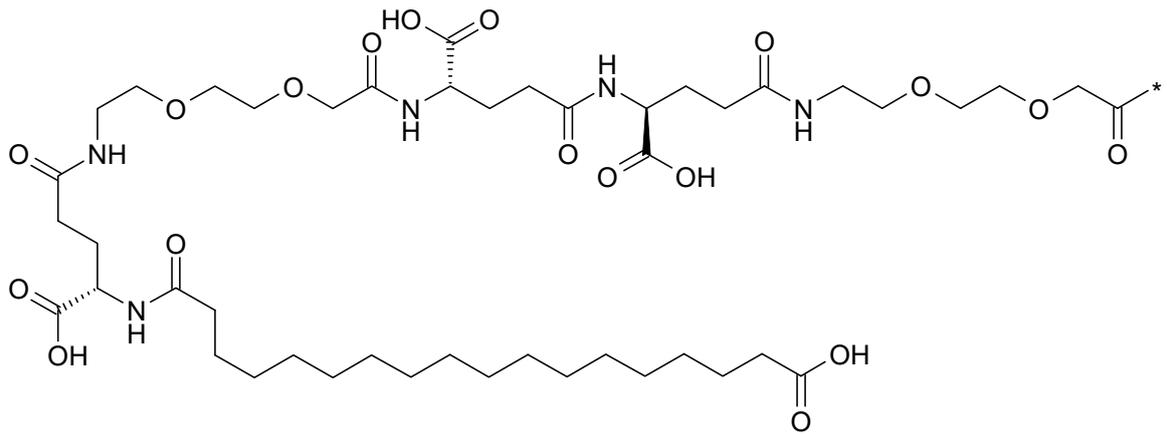
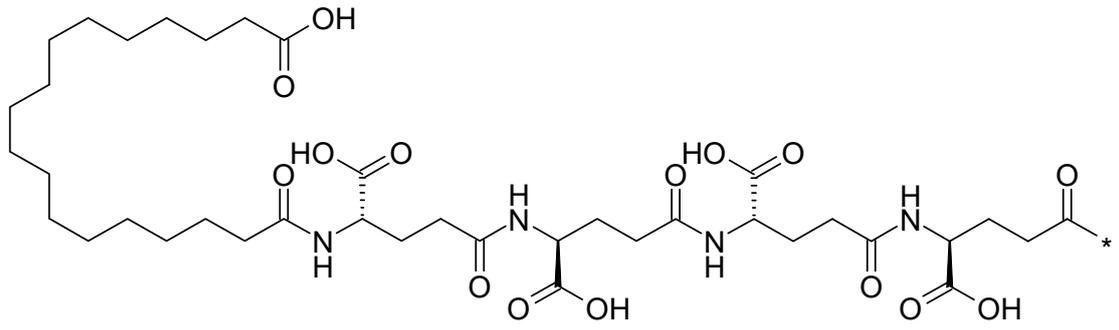
Z4 está ausente o representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IId, IIe, IIIf, IIg, IIh, III, IIj o IIk; en donde cada resto de aminoácido es independientemente L o D, en donde Z4 se conecta a través del carbono con el símbolo * al nitrógeno épsilon de Lys en la posición 24 del péptido de glucagón,

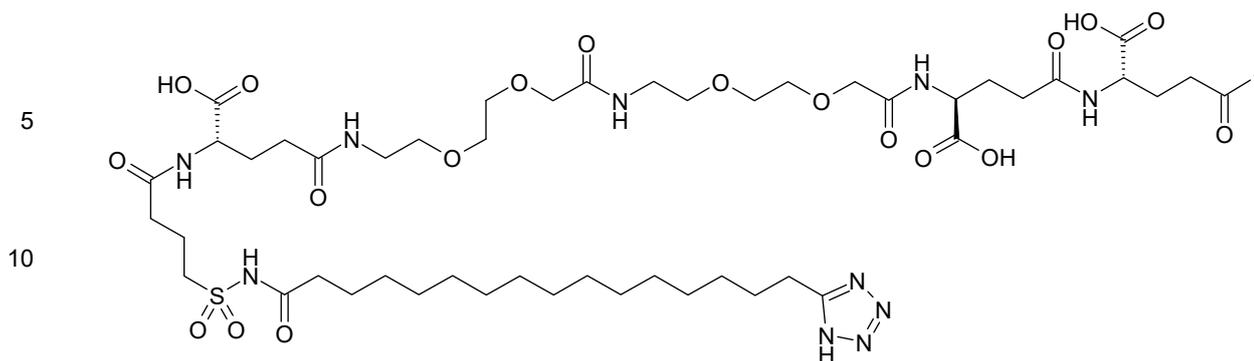
con la condición de que Z₂ o Z₄ o ambos Z₂ y Z₄ están presentes en dicho sustituyente.

6. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho sustituyente representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf, IIIg, IIIh, IIIi, IIIj, IIIk, IIIl, IIIm, IIIn, IIIo, IIIp, IIIq, IIIr, IIIs, IIIt, IIIu, IIIv, IIIw, IIIx o IIIy:

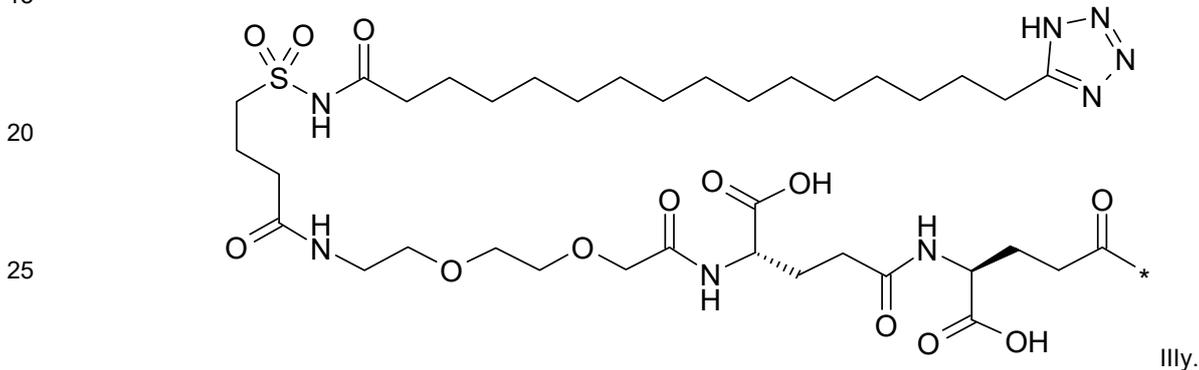






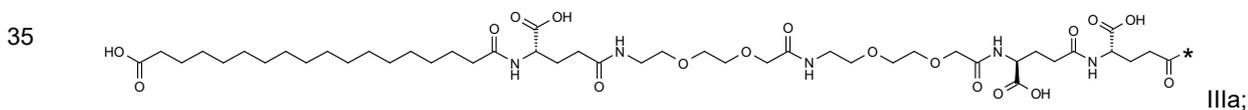


IIIx o

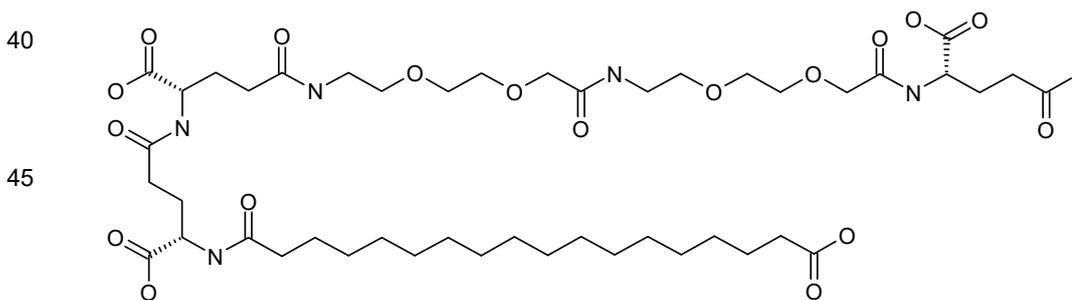


IIIy.

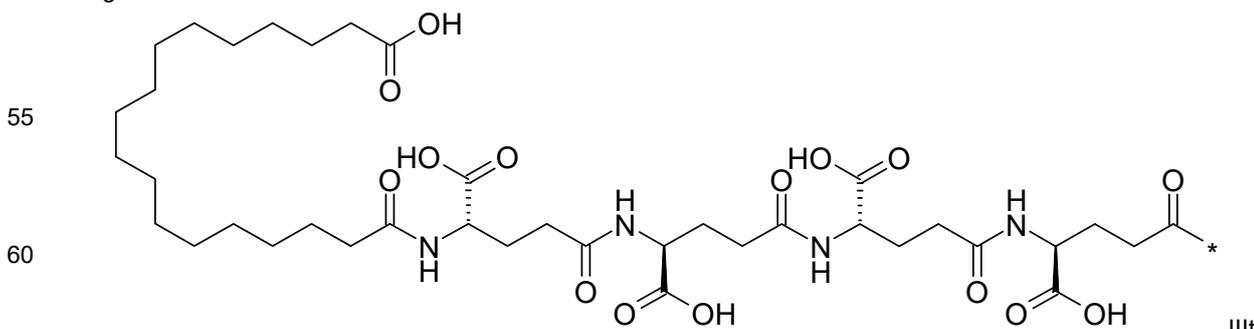
- 30 7. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho sustituyente representa una estructura de acuerdo con una de las fórmulas IIIa, IIIp o IIIt:



IIIa;



IIIp



IIIt.

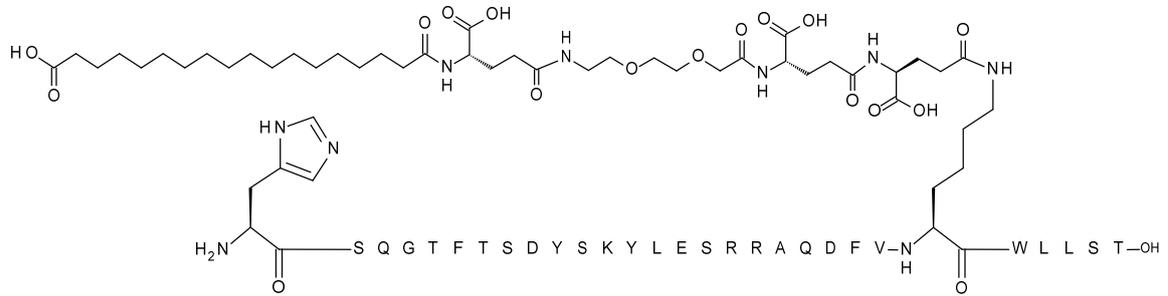
- 65 8. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado del grupo que consiste en:

Sustancia química 1:

5

10

15



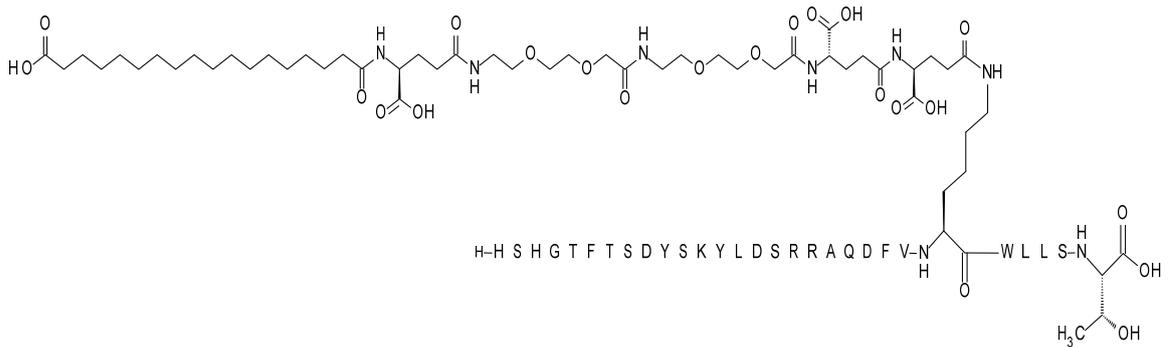
20

Sustancia química 2:

25

30

35



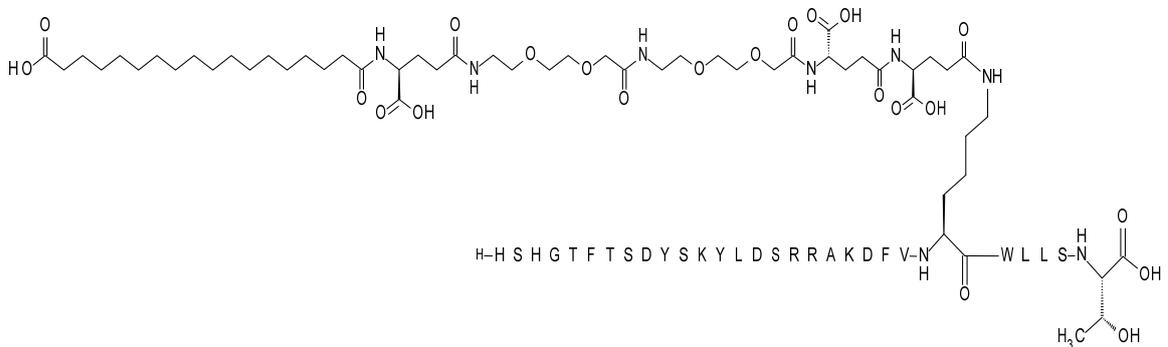
40

Sustancia química 3:

45

50

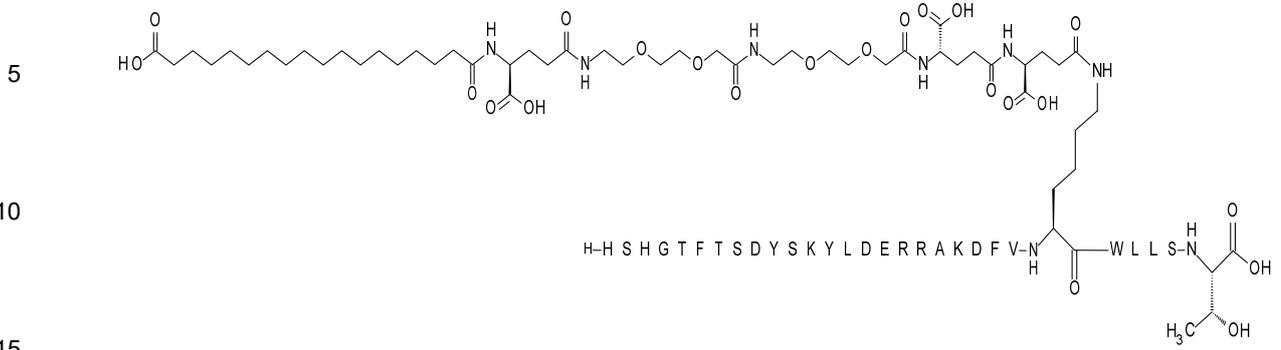
55



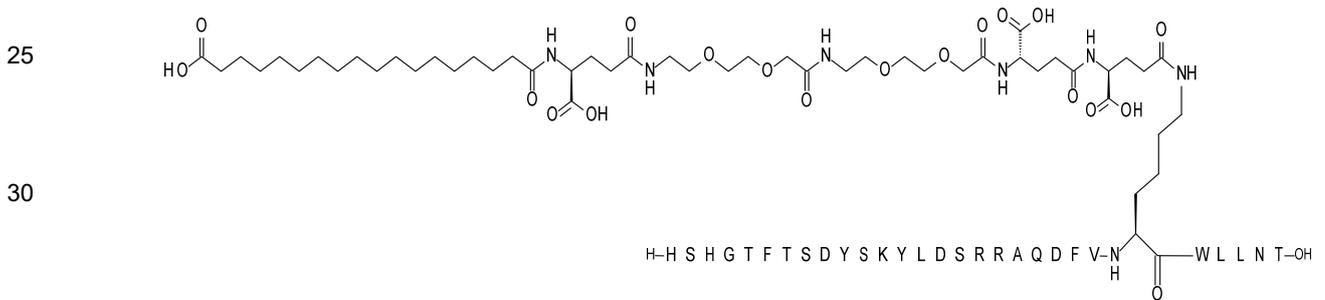
60

Sustancia química 4:

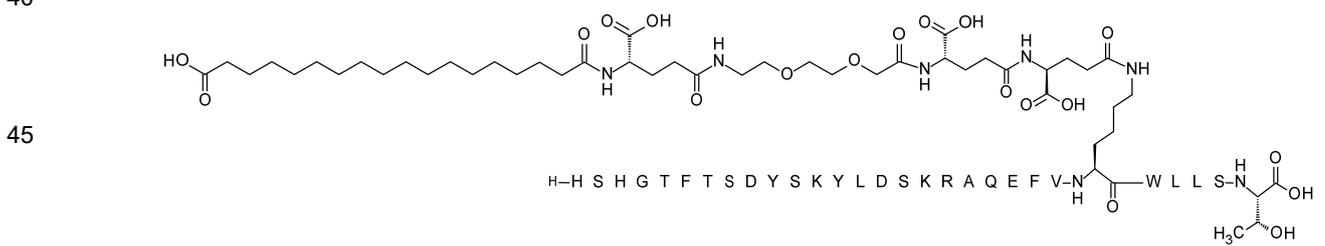
65



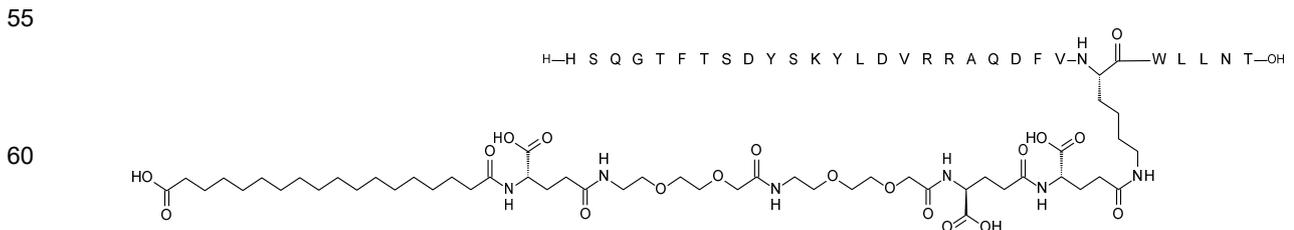
Sustancia química 5:



Sustancia química 6:



Sustancia química 7:

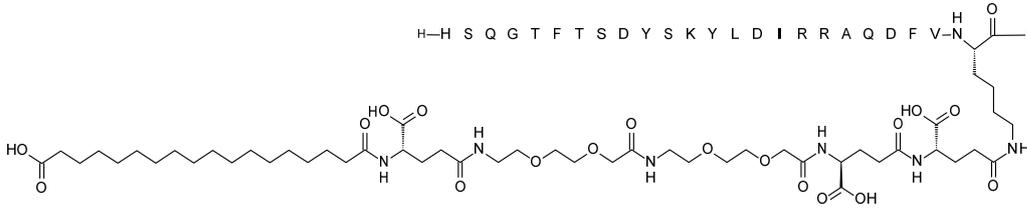


Sustancia química 8:

5

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D I R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L N T-OH

10



Sustancia química 9:

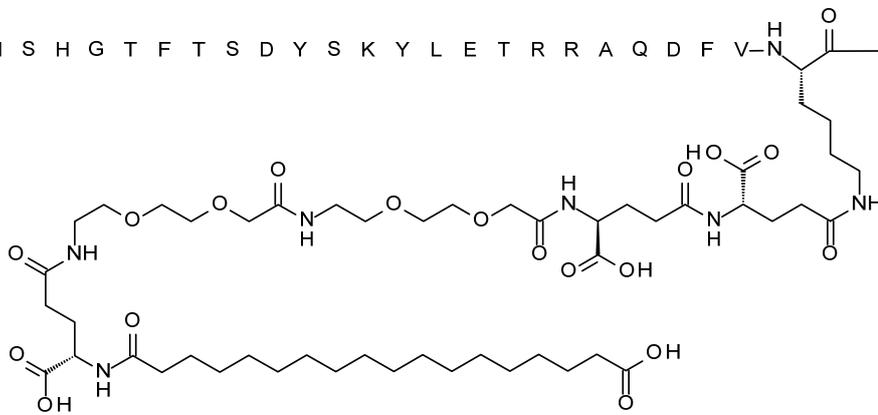
15

20

H-H S H G T F T S D Y S K Y L E T R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L N T-OH

25

30



35

Sustancia química 10:

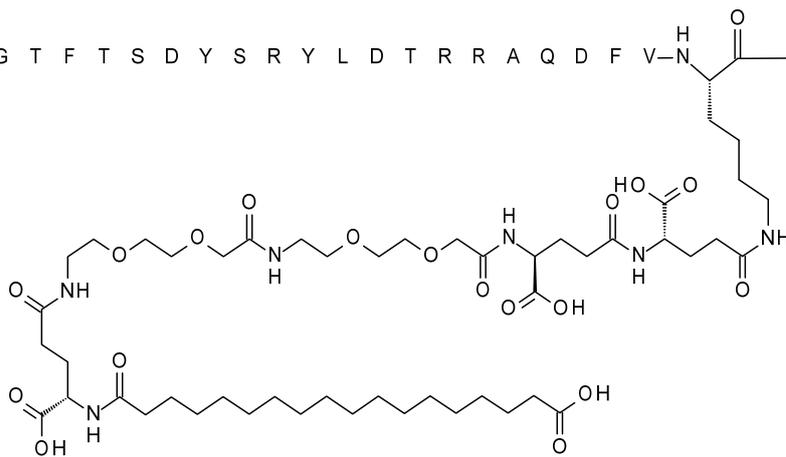
40

H-H S Q G T F T S D Y S R Y L D T R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L N T-OH

45

50

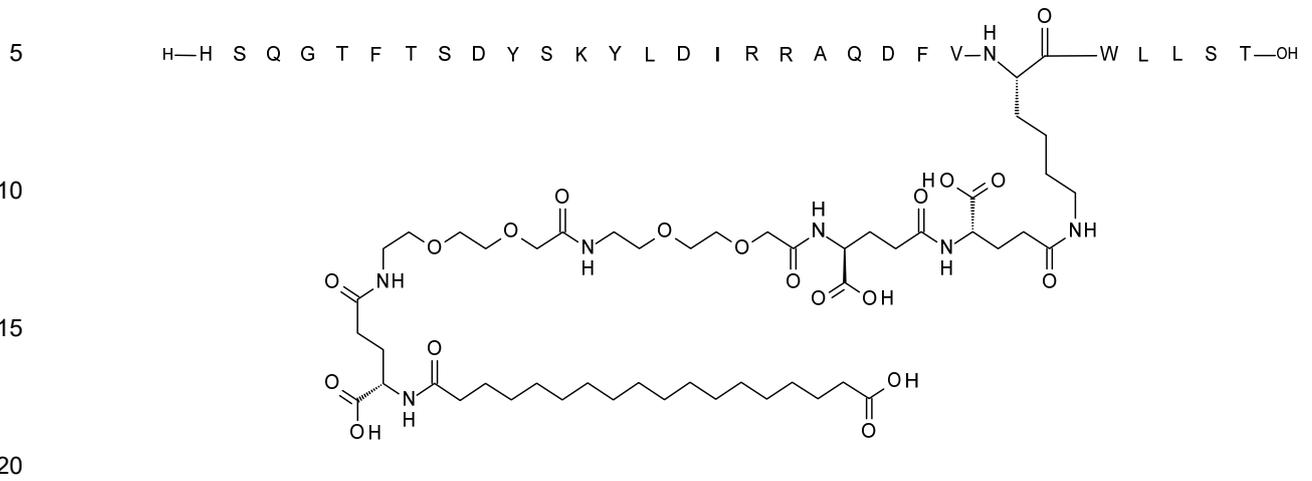
55



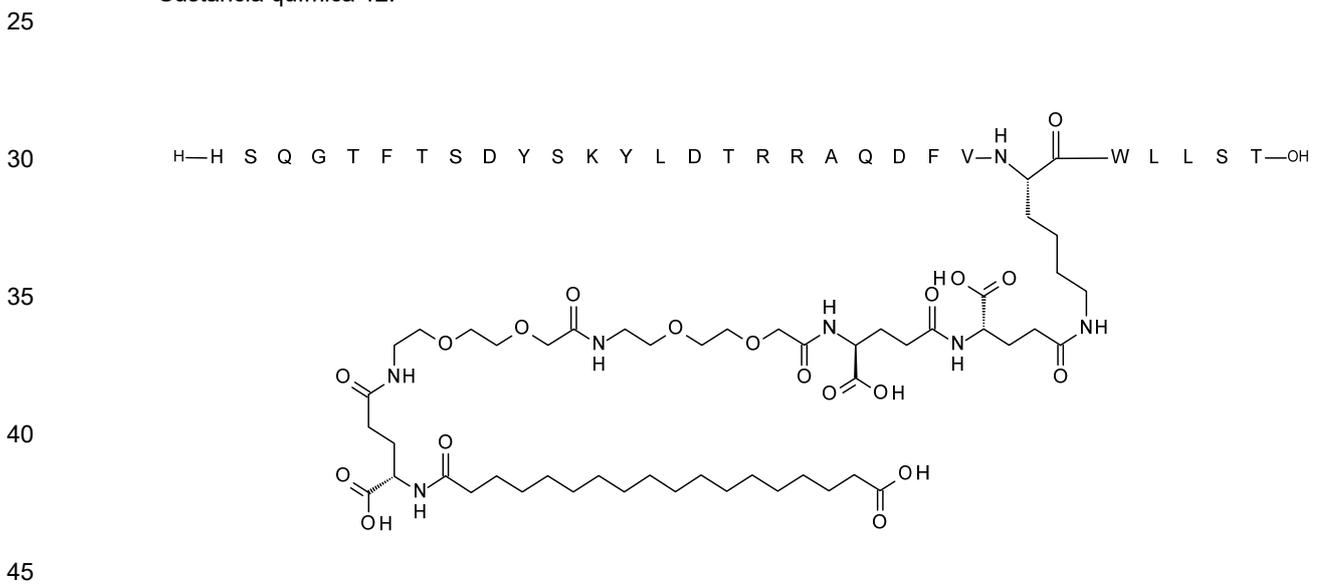
60

Sustancia química 11:

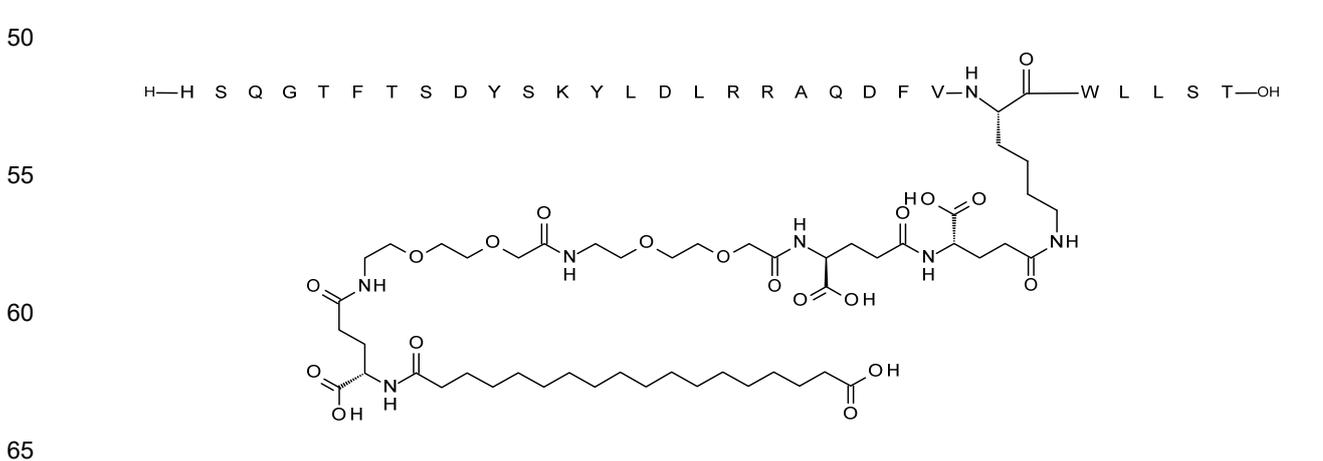
65



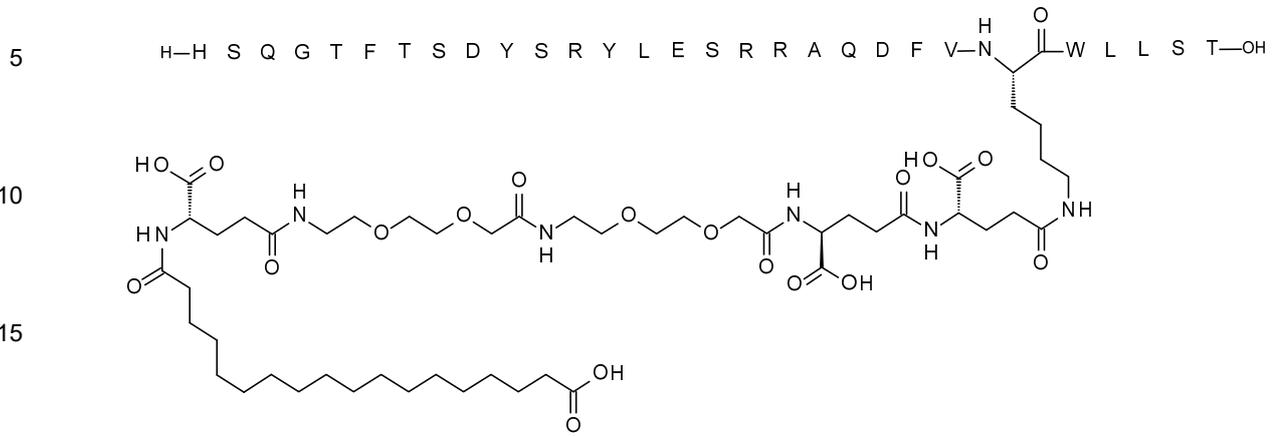
Sustancia química 12:



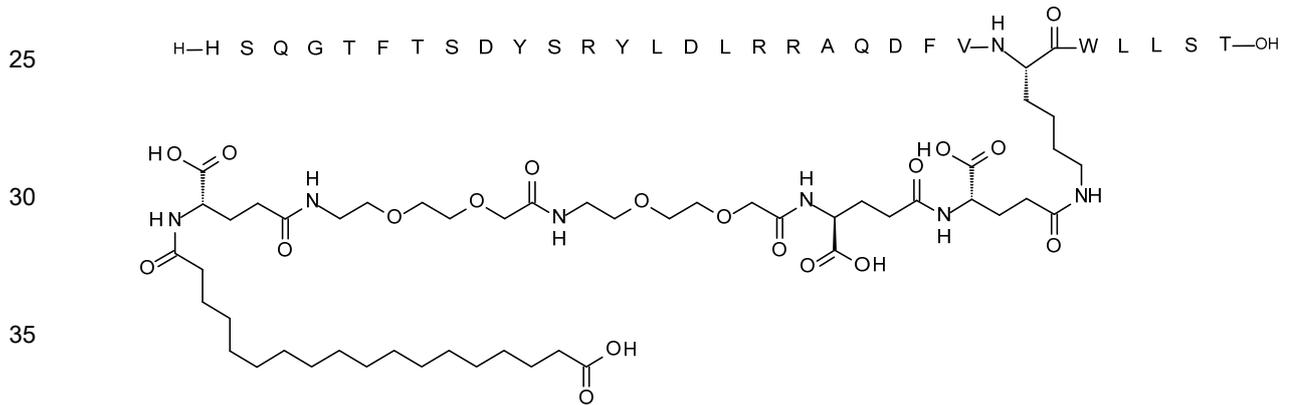
Sustancia química 13:



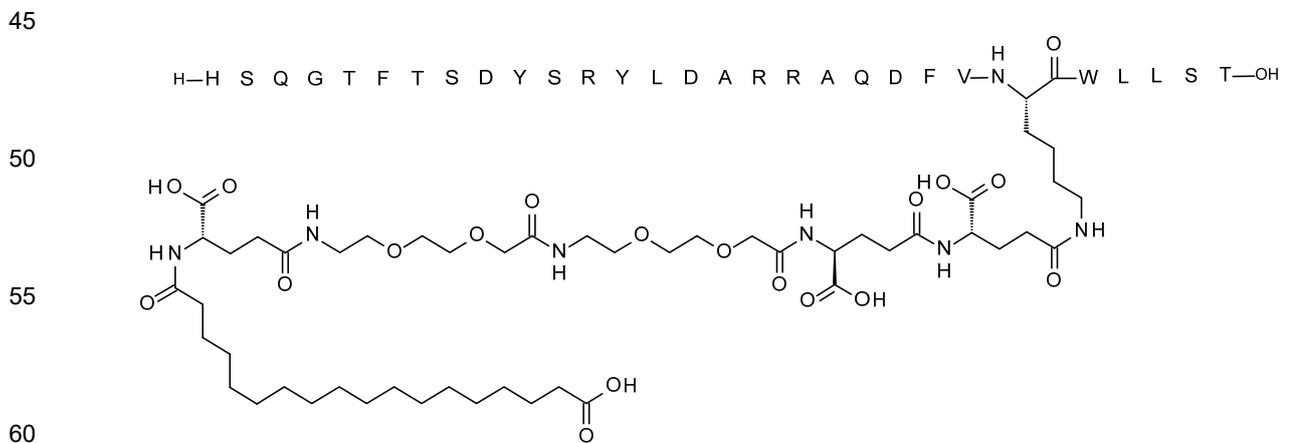
Sustancia química 14:



Sustancia química 15:



Sustancia química 16:

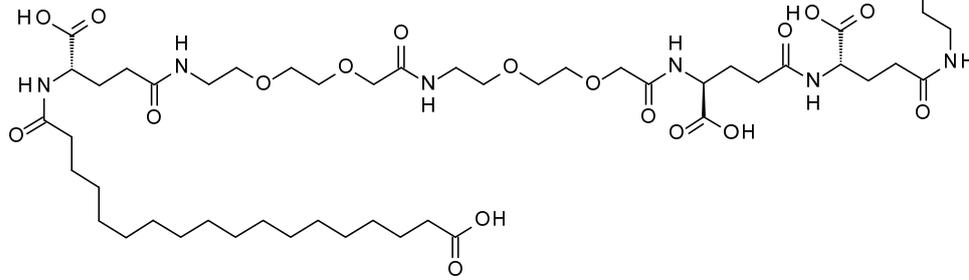


Sustancia química 17:

5



10



15

20

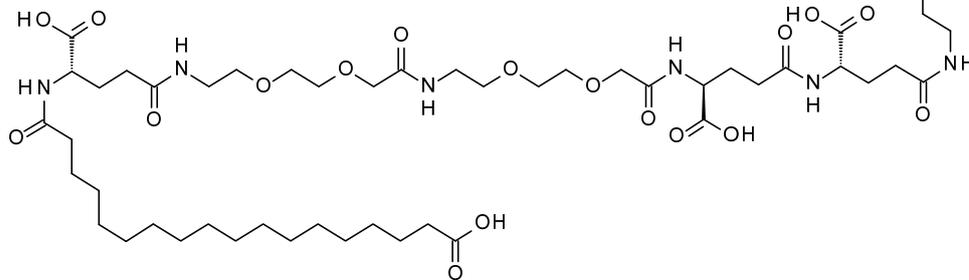
25

Sustancia química 18:

30



35



40

45

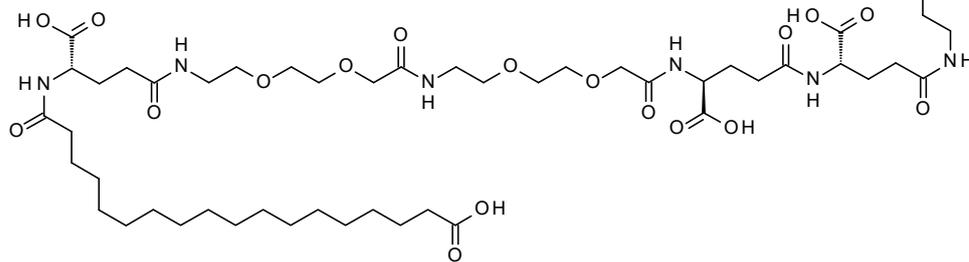
50

Sustancia química 19:

55



60



65

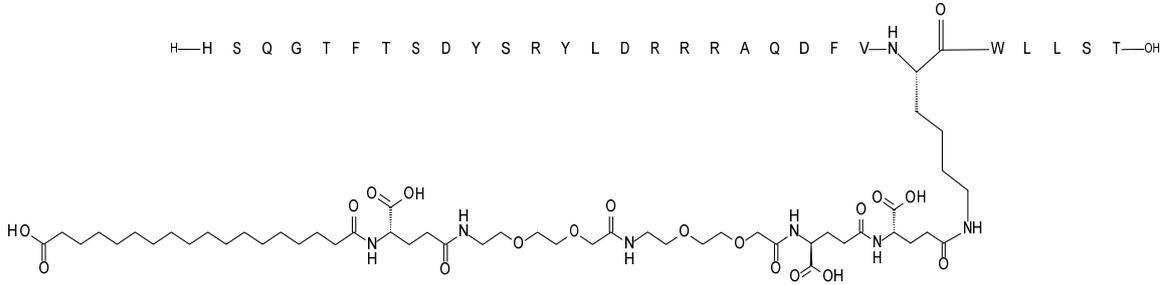
Sustancia química 20:

5



10

15



20

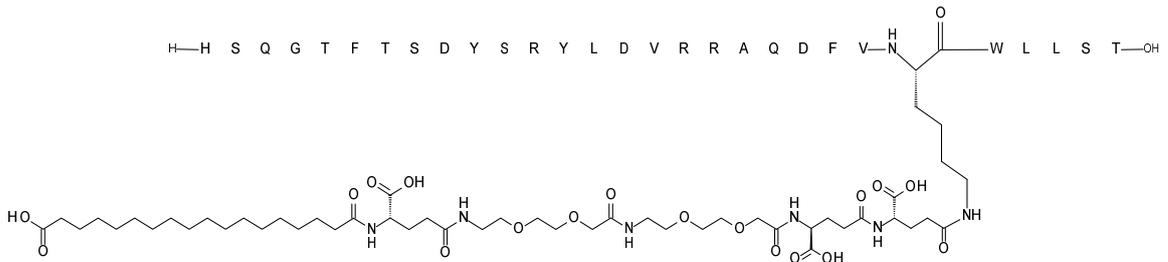
Sustancia química 21:

25



30

35



40

Sustancia química 22:

45



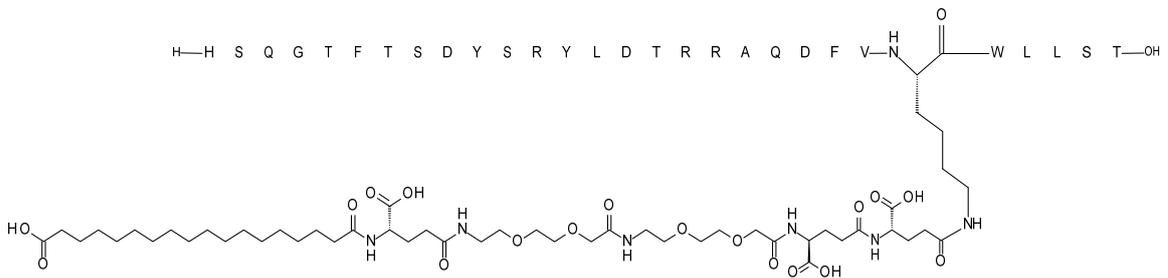
50

55

Sustancia química 23:

60

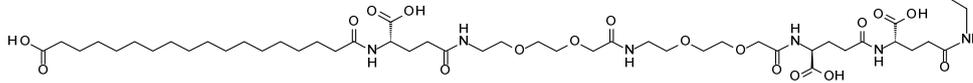
65



5



10



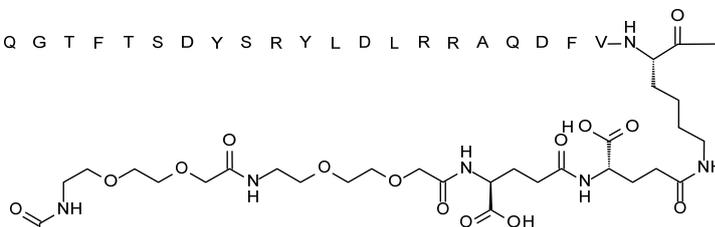
15

Sustancia química 24

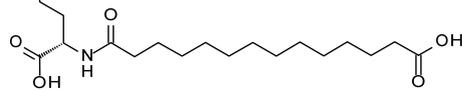
20



25



30



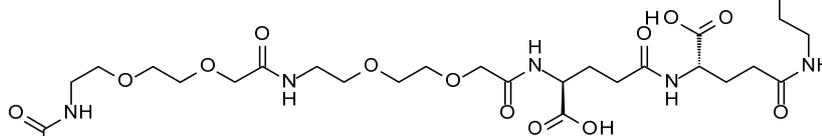
35

Sustancia química 25:

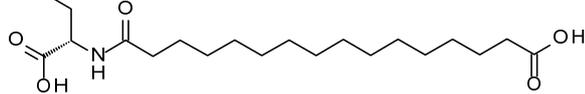
40



45



50

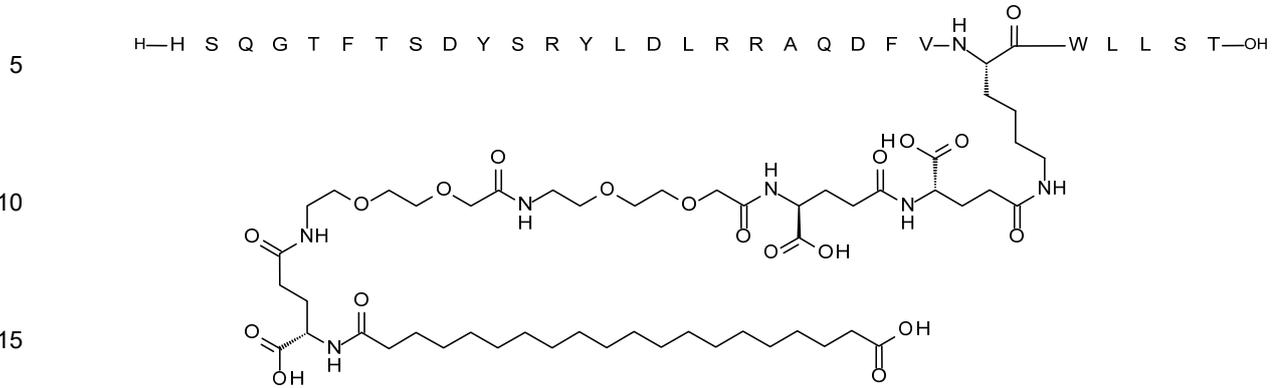


55

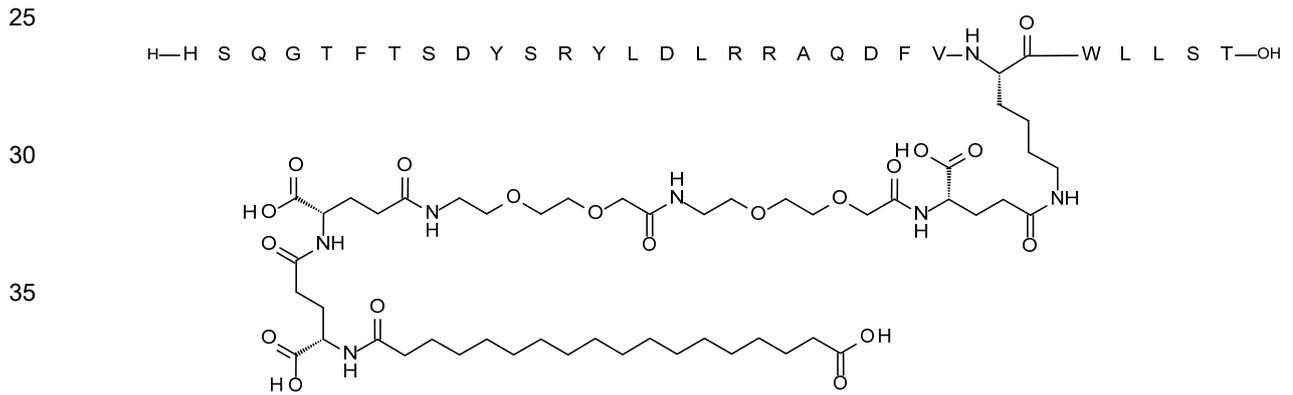
Sustancia química 26:

60

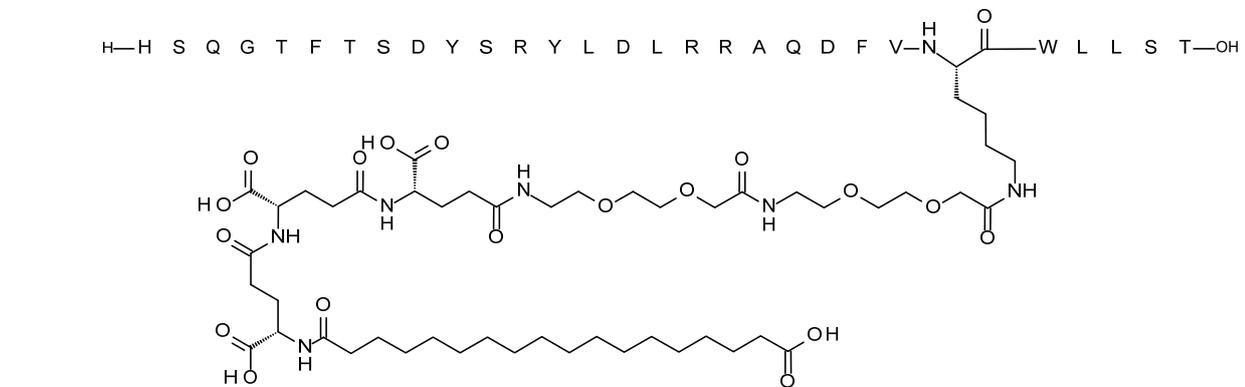
65



Sustancia química 27:



Sustancia química 28:

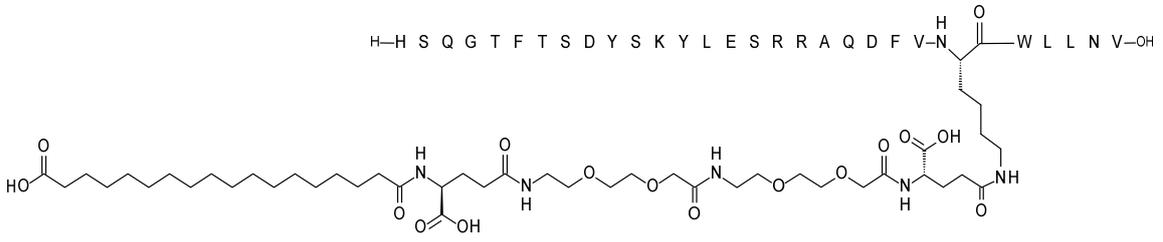


Sustancia química 29:

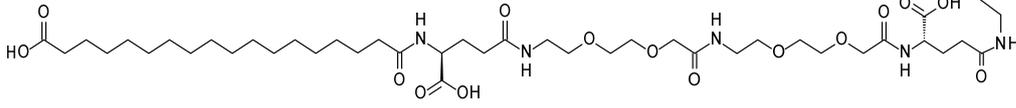
ES 2 767 705 T3

Sustancia química 33:

5

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V-N 

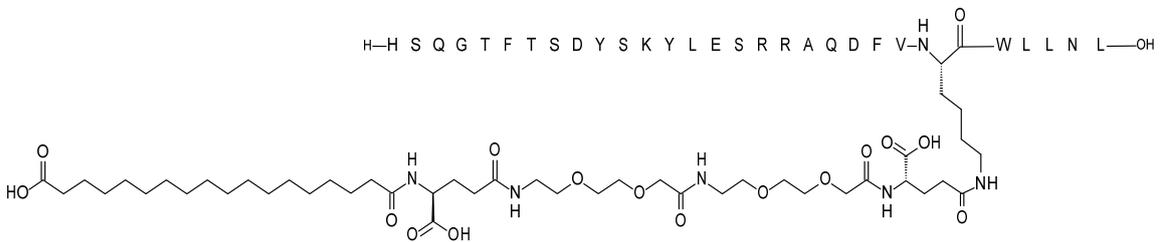
10



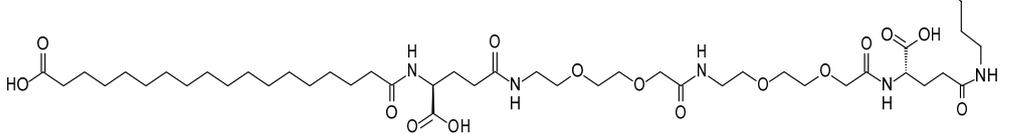
15

Sustancia química 34:

20

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V-N 

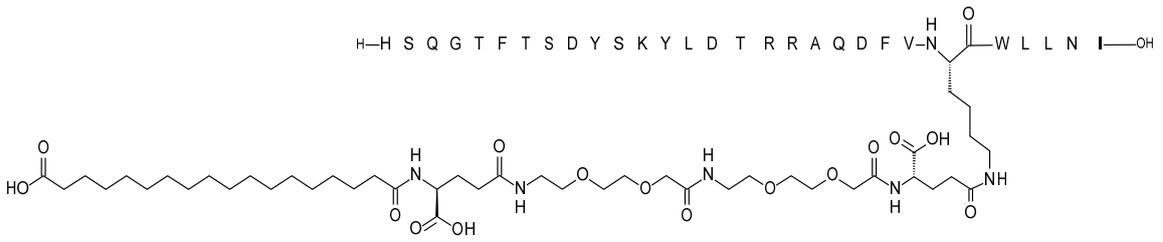
25



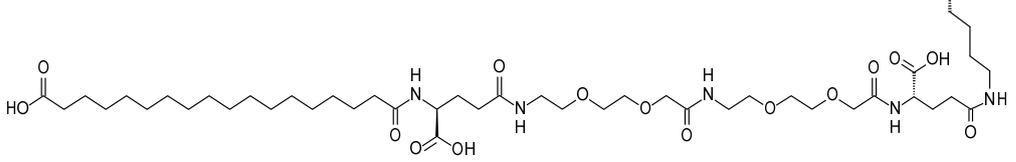
30

Sustancia química 35:

35

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D T R R A Q D F V-N 

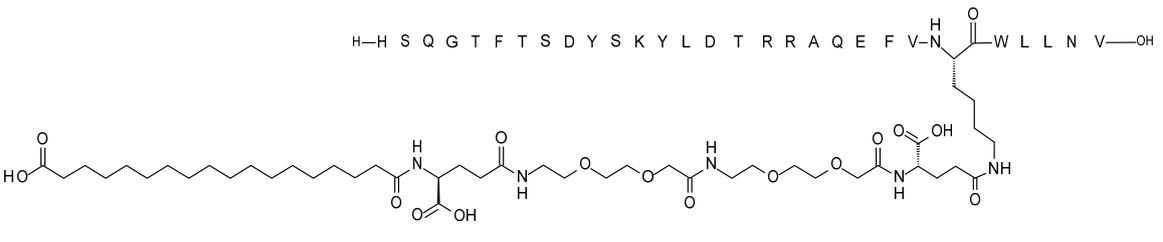
40



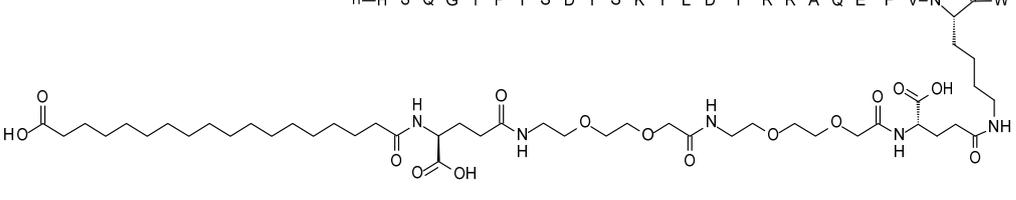
45

Sustancia química 36:

50

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D T R R A Q E F V-N 

55



60

65

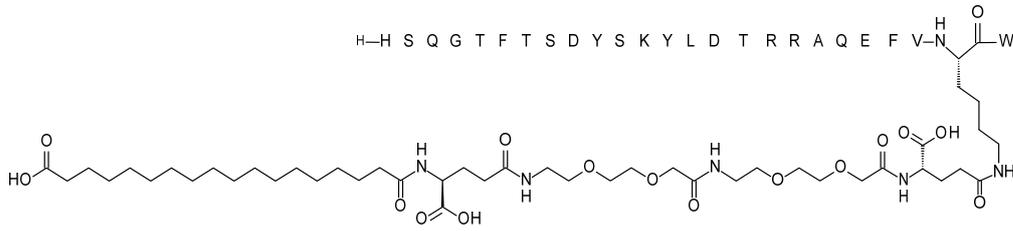
Sustancia química 37:

ES 2 767 705 T3

5



10



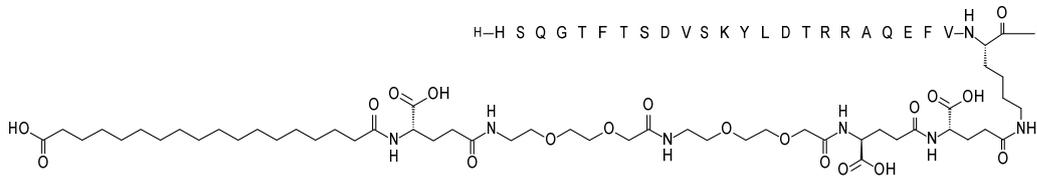
15

Sustancia química 38:

20



25



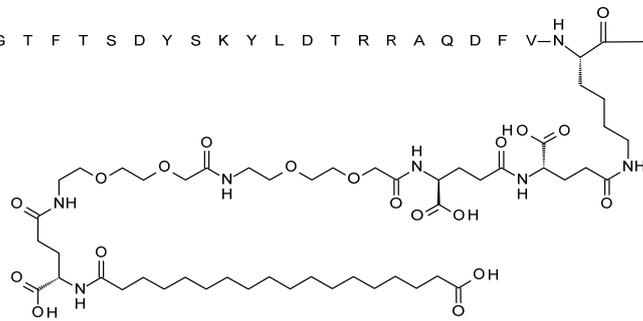
Sustancia química 39:

30



35

40



45

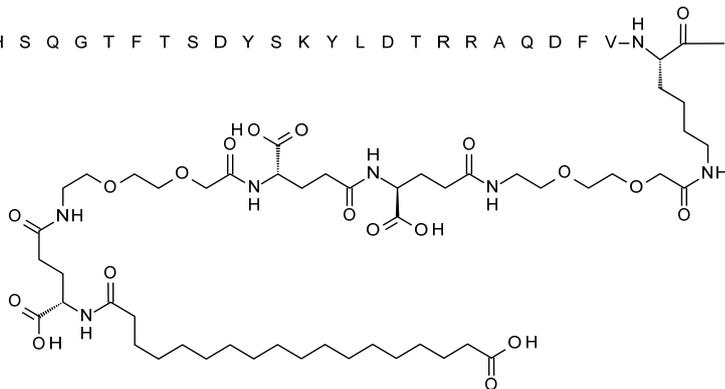
Sustancia química 40:

50



55

60



65

Sustancia química 41:

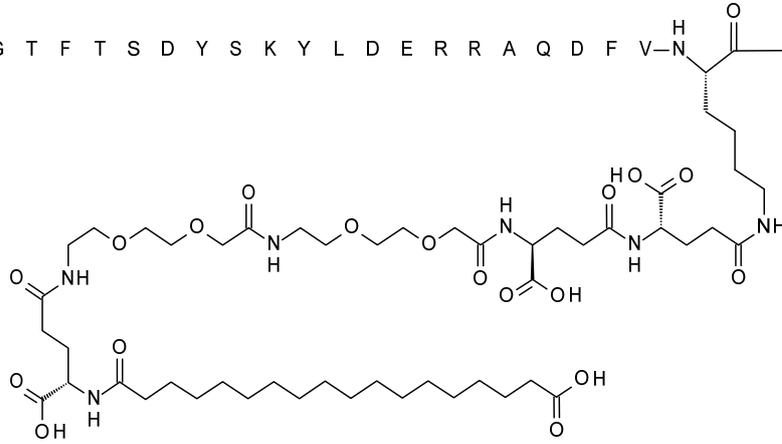
5

H—H S Q G T F T S D Y S K Y L D E R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

10

15

20



25

Sustancia química 42:

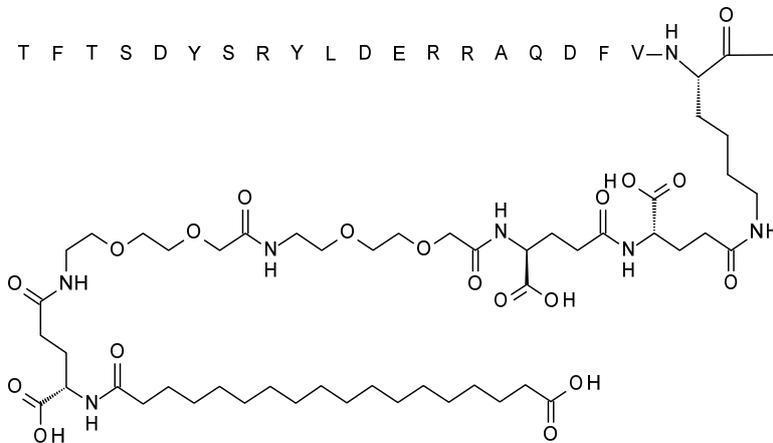
30

H—H S Q G T F T S D Y S R Y L D E R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

35

40

45



50

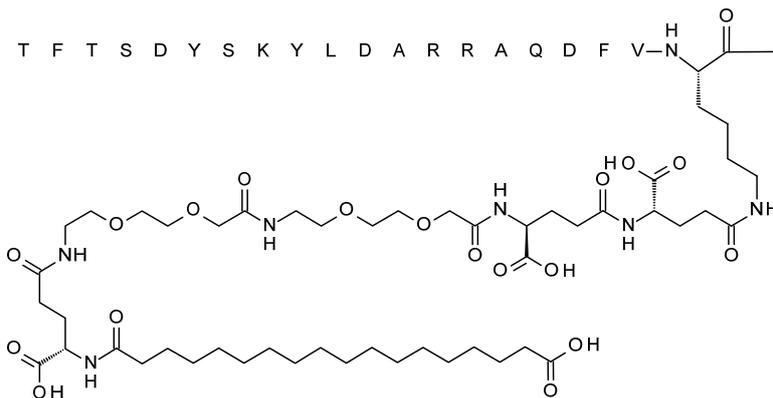
Sustancia química 43:

55

H—H S Q G T F T S D Y S K Y L D A R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L S T—OH

60

65



Sustancia química 44:

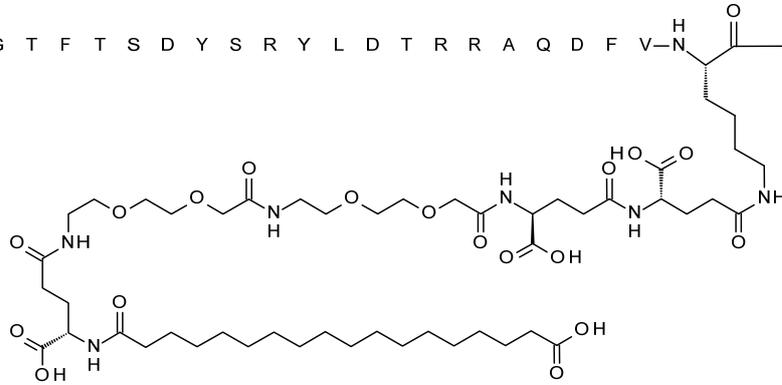
5

H-H S Q G T F T S D Y S R Y L D T R R A Q D F V-N^H C(=O) W L E S T-OH

10

15

20



Sustancia química 45:

25

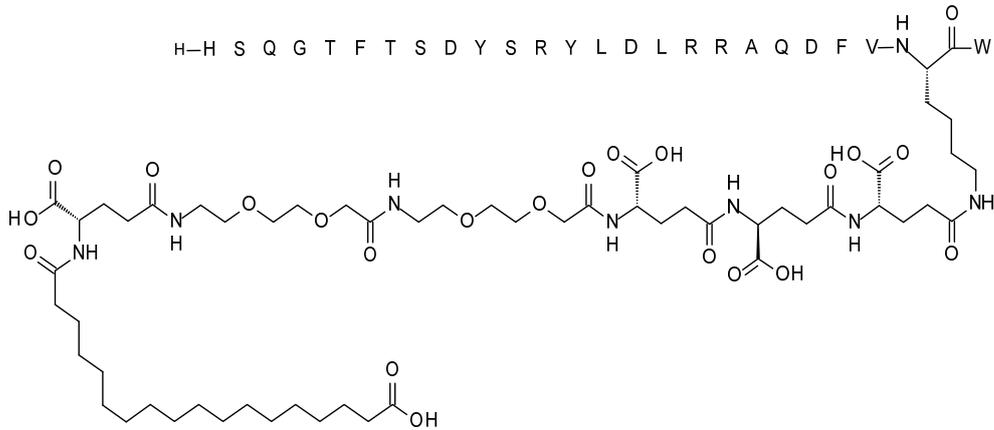
30

H-H S Q G T F T S D Y S R Y L D L R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L S T-OH

35

40

45



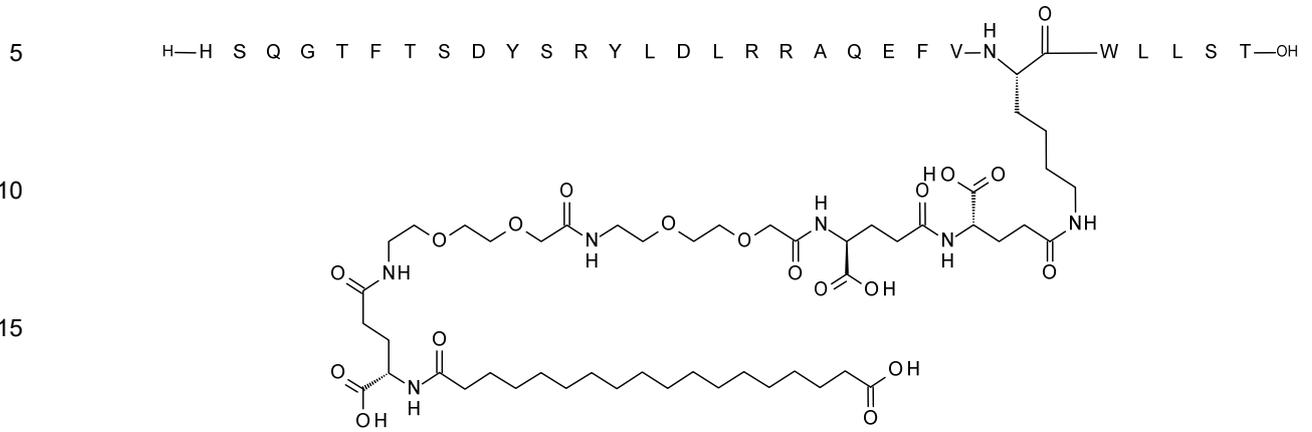
50

Sustancia química 46:

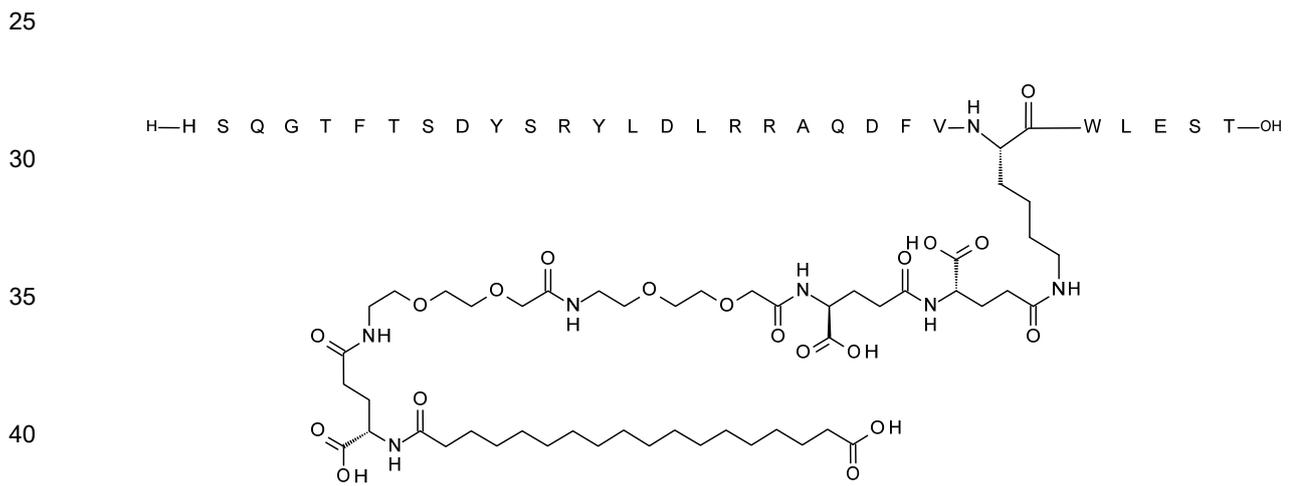
55

60

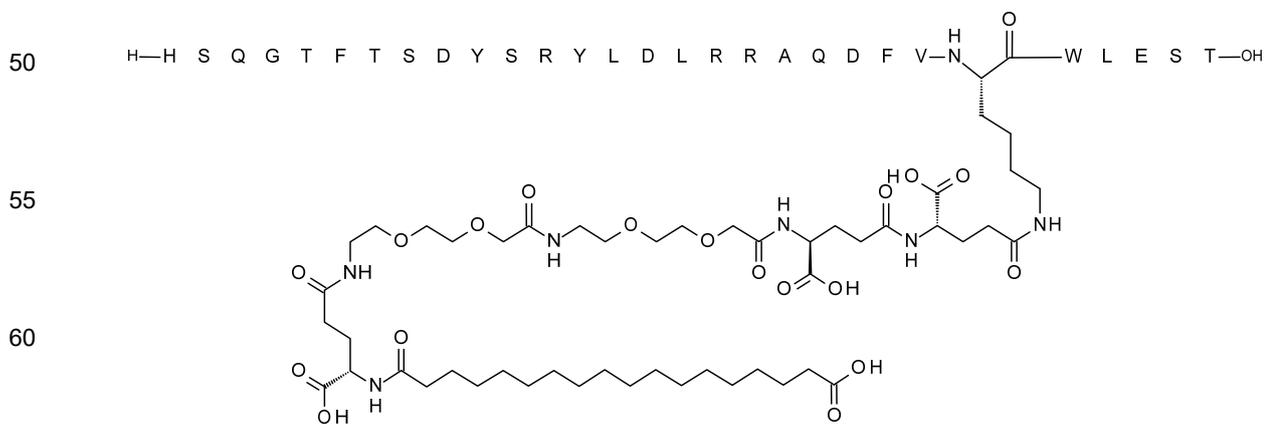
65



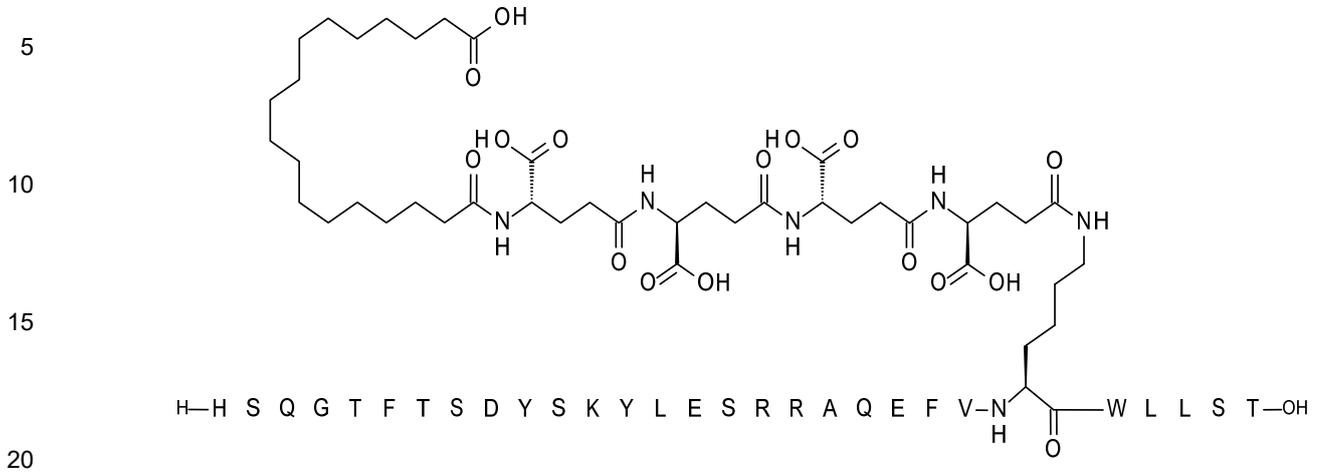
Sustancia química 47:



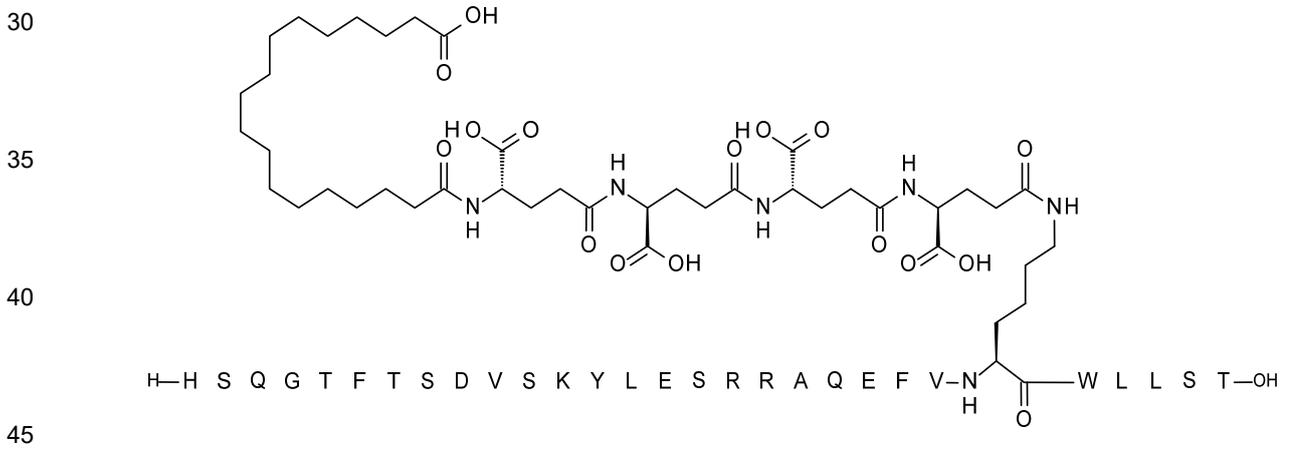
Sustancia química 48:



Sustancia química 49:



25 Sustancia química 50:

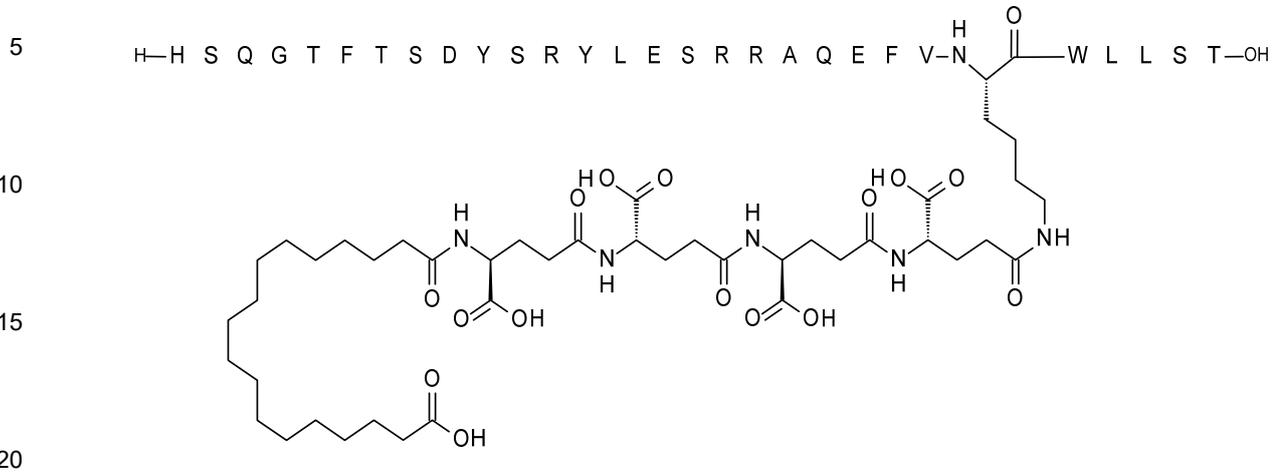


50 Sustancia química 51:

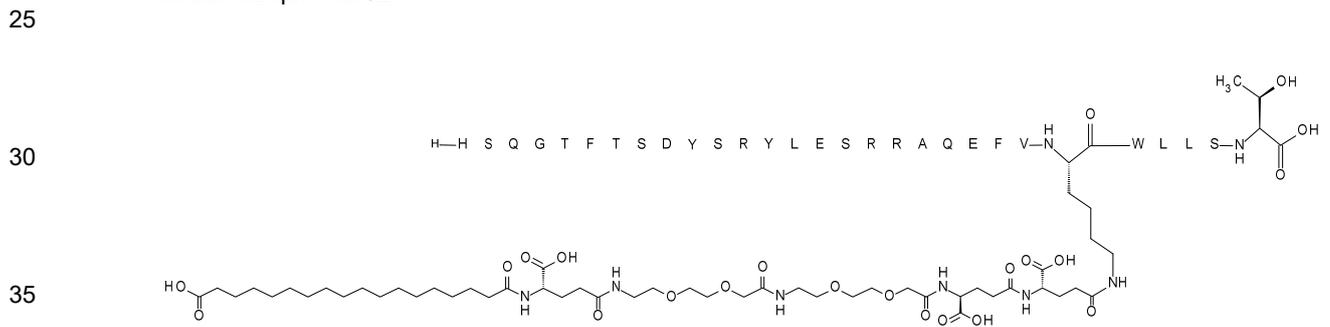
55

60

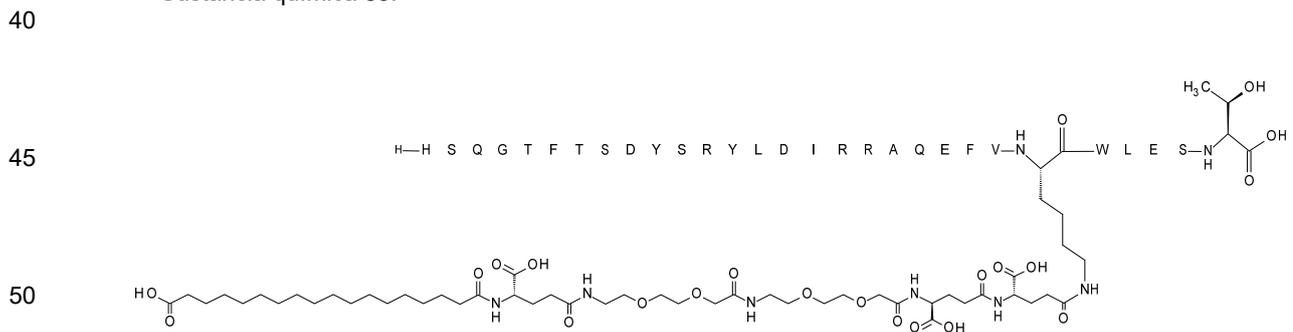
65



Sustancia química 52:



Sustancia química 53:



Sustancia química 54:

55

60

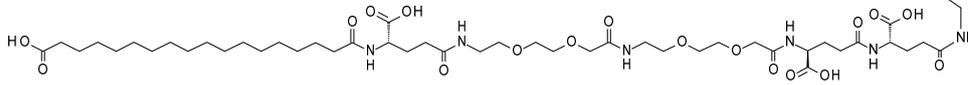
65

ES 2 767 705 T3

5

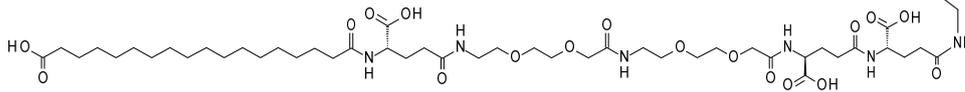


10



15

Sustancia química 55:



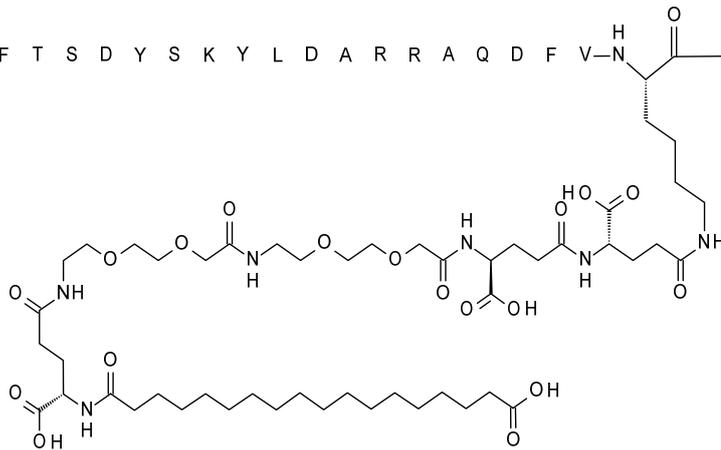
20

Sustancia química 56:

25



30



35

40

45

Sustancia química 57:

50

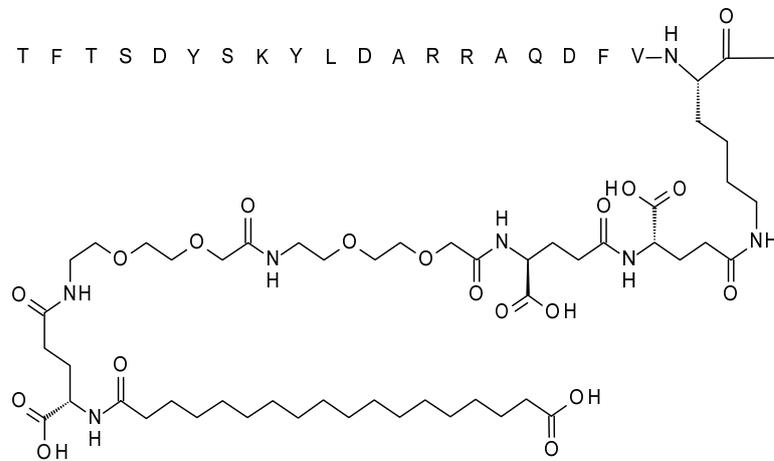
5



10

15

20



25

Sustancia química 58:

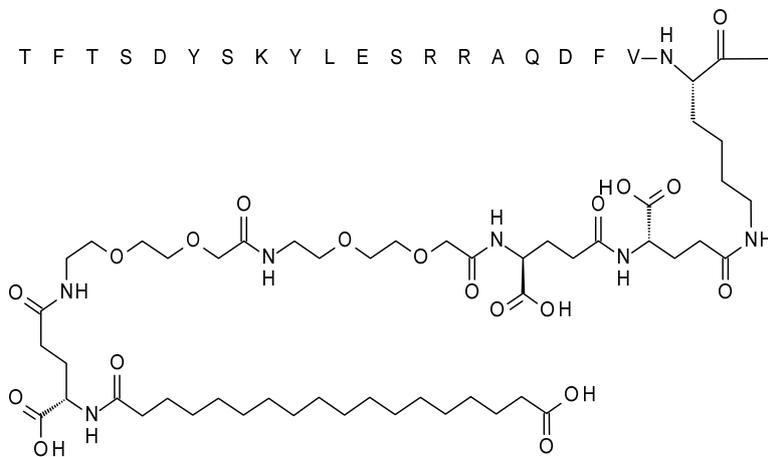
30



35

40

45



50

Sustancia química 59:

55

60

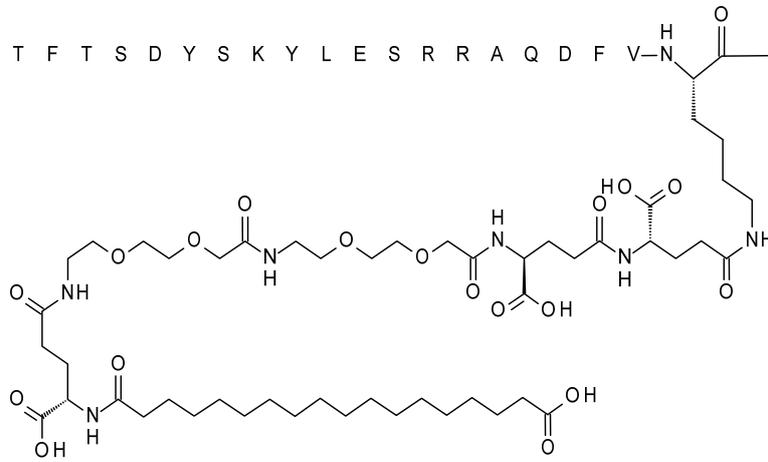
65

5 H—H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L E S T—OH

10

15

20



25

Sustancia química 60:

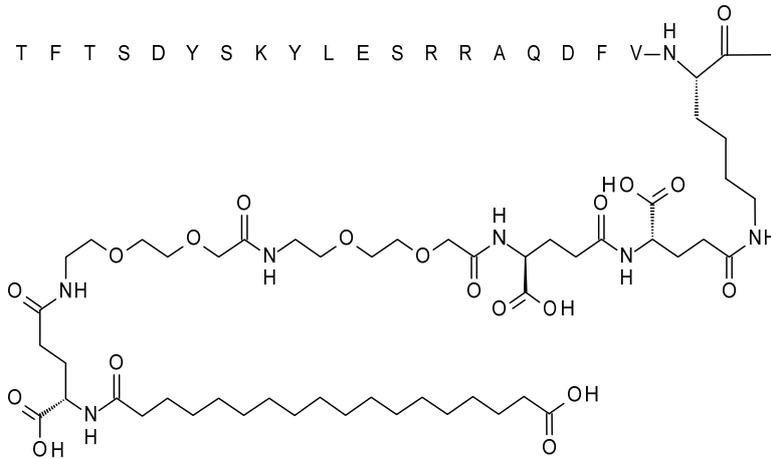
30

H—H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A Q D F V—N^H—C(=O)—W L L Q T—OH

35

40

45



50

Sustancia química 61:

55

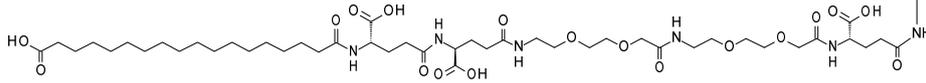
60

65

5



10



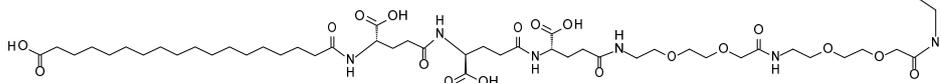
15

Sustancia química 62:

20



25



30

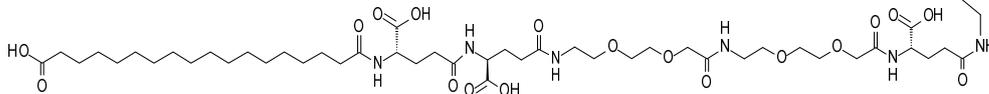
35

Sustancia química 63:

40



45



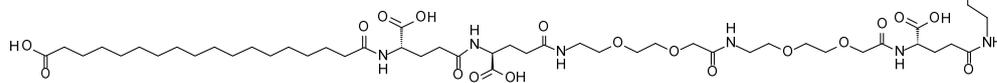
50

Sustancia química 64:

55



60



65

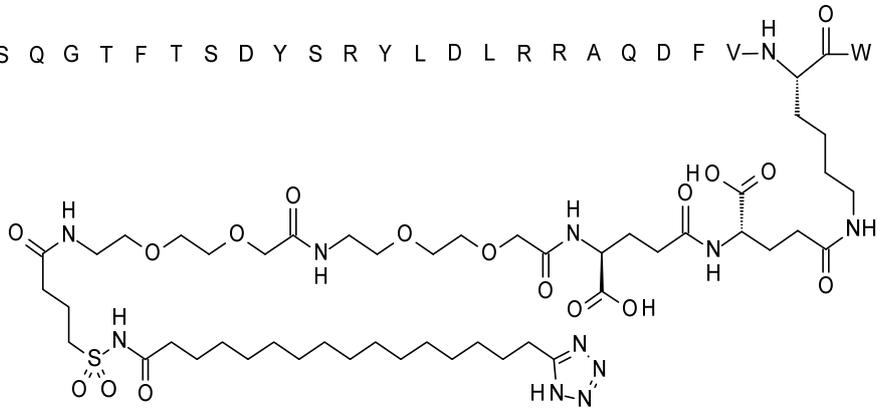
5



10

15

20



25

Sustancia química 69:

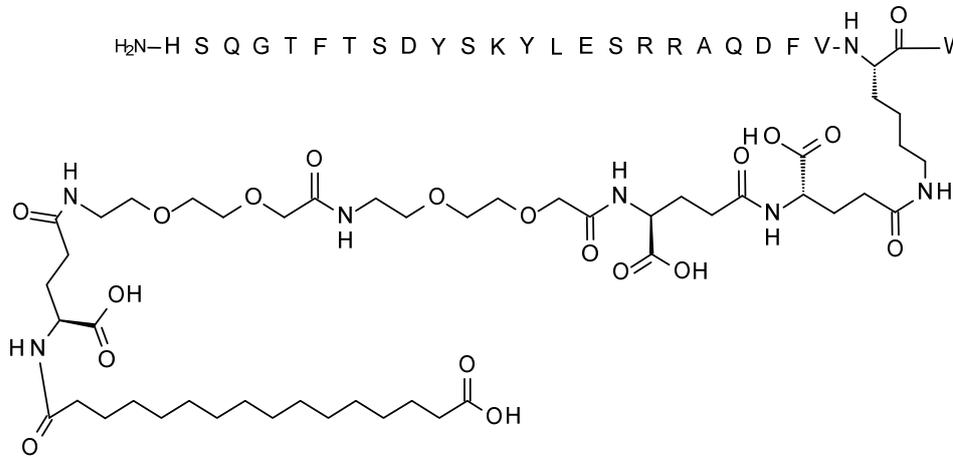
30



35

40

45



50

Sustancia química 70:

55

60

65

Sustancia química 73:

5

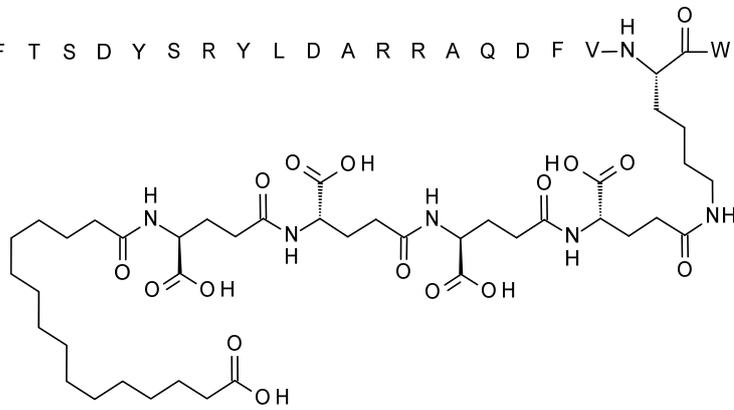
H-H S Q G T F T S D Y S R Y L D A R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L S T-OH

10

15

20

25



Sustancia química 74:

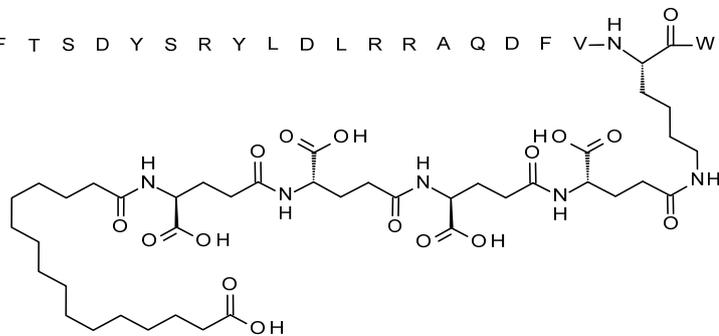
30

35

40

45

H-H S Q G T F T S D Y S R Y L D L R R A Q D F V-N^H C(=O) W L L S T-OH



50

Sustancia química 75:

55

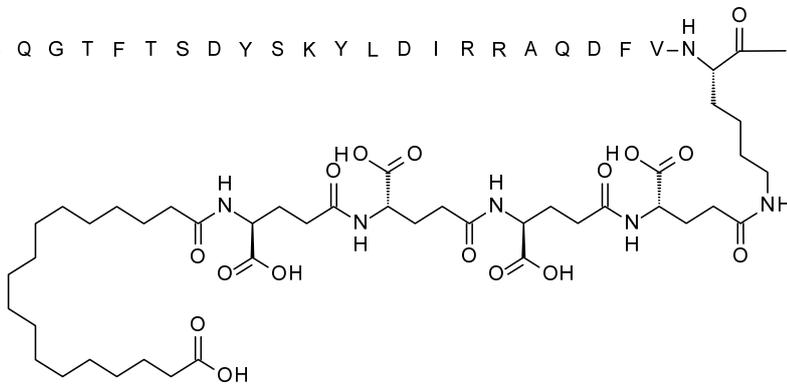
60

65

5

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D I R R A Q D F V-N^H C(=O)-W L L S T-NH₂

10



15

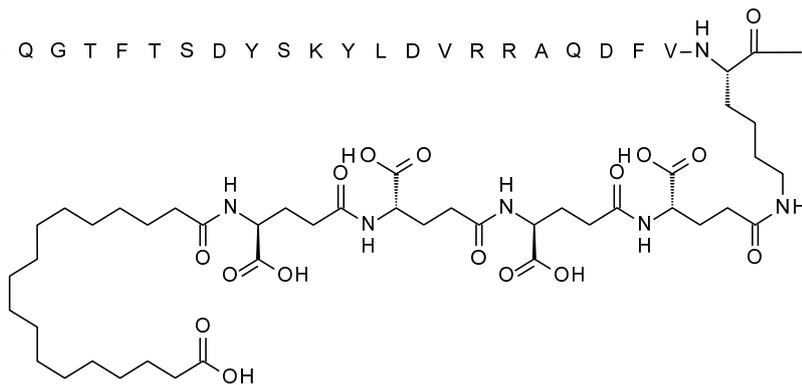
20

Sustancia química 76:

25

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D V R R A Q D F V-N^H C(=O)-W L L S T-NH₂

30



35

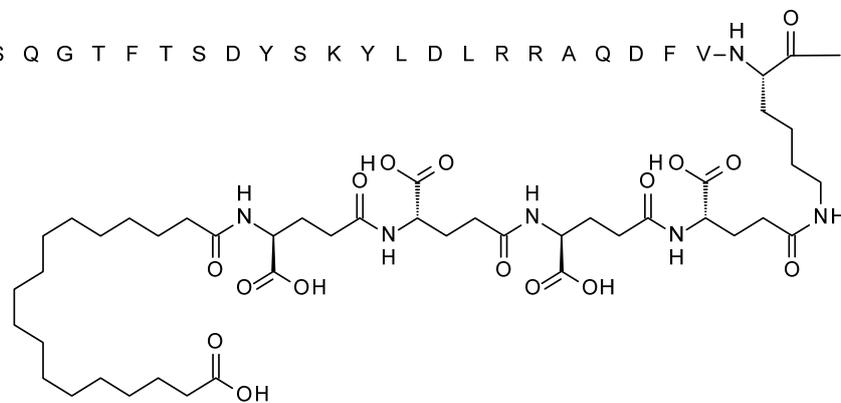
40

Sustancia química 77:

45

H-H S Q G T F T S D Y S K Y L D L R R A Q D F V-N^H C(=O)-W L L S T-NH₂

50

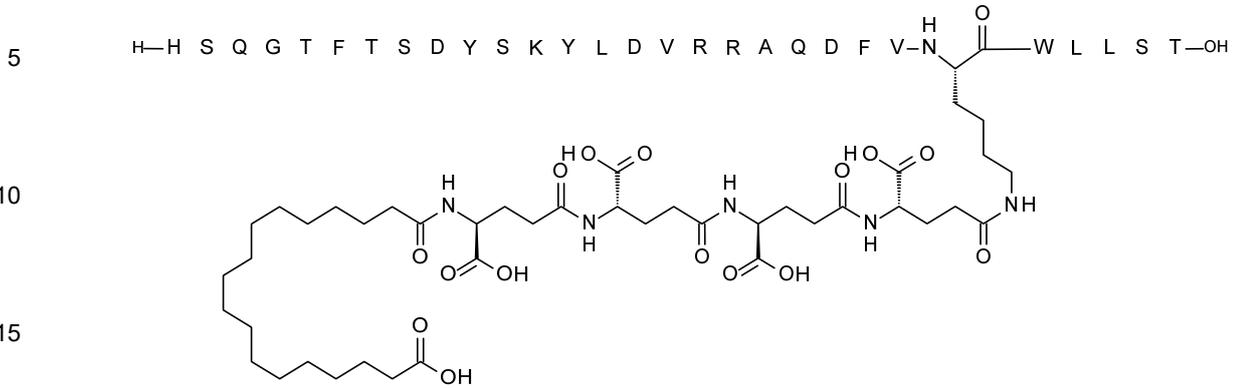


55

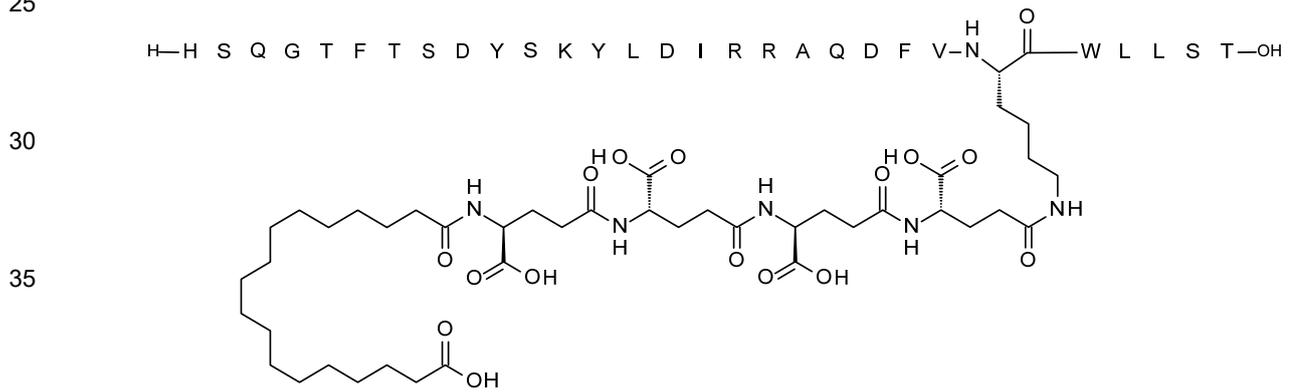
60

65

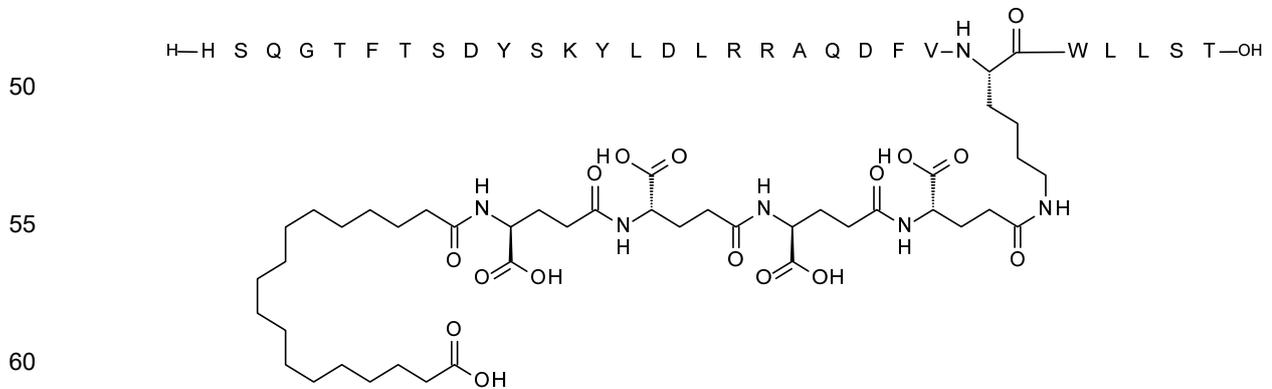
Sustancia química 78:



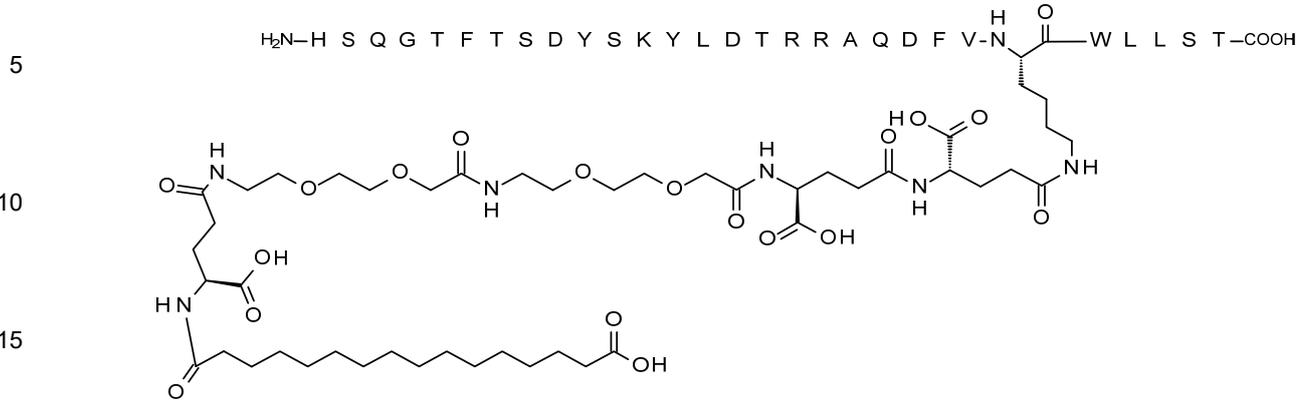
Sustancia química 79:



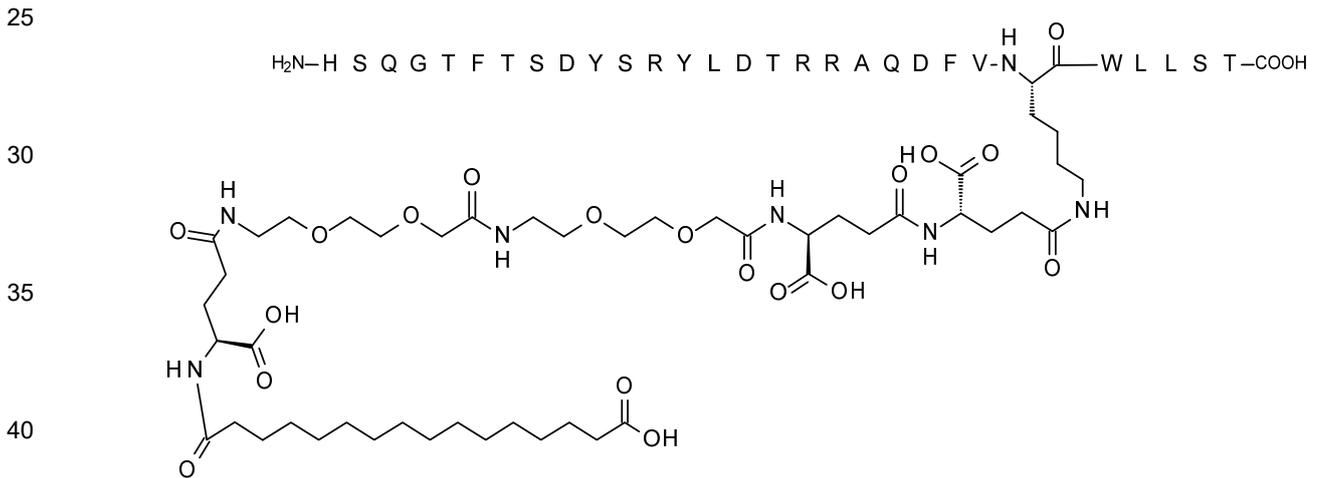
Sustancia química 80:



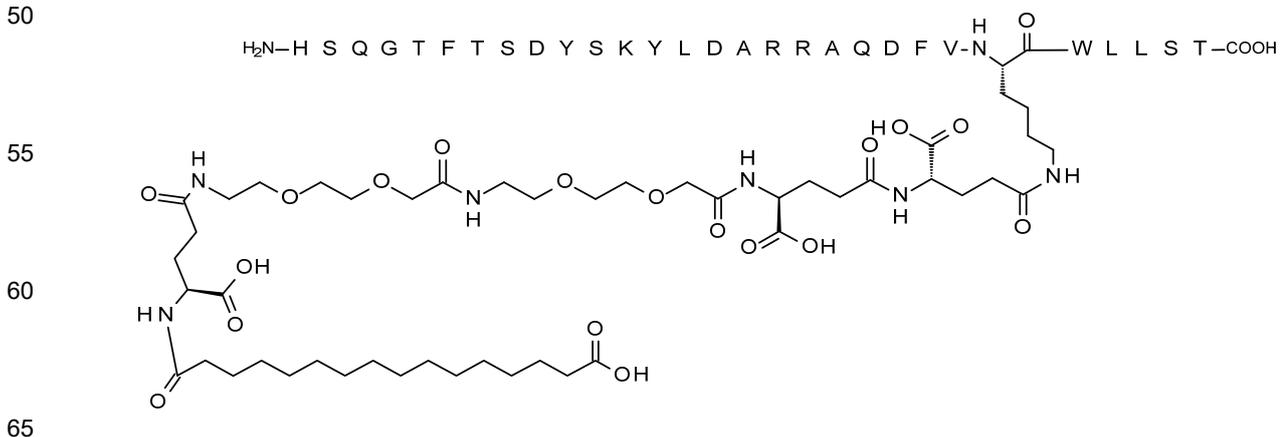
Sustancia química 81:



Sustancia química 82:



Sustancia química 83:

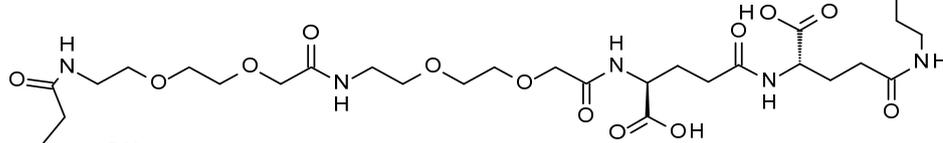


Sustancia química 84

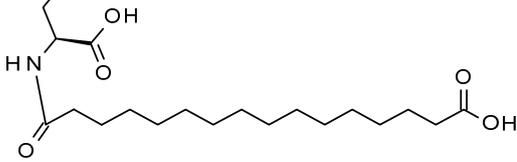
5



10



15



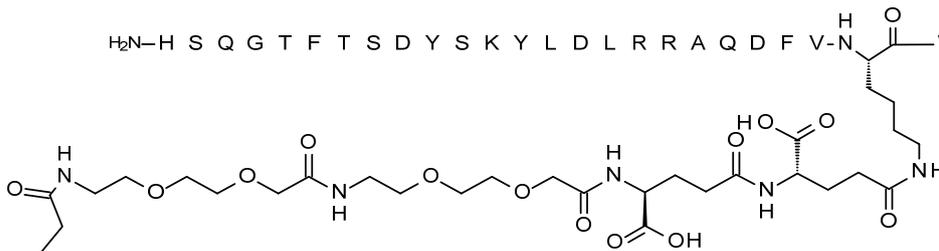
20

Sustancia química 85:

25

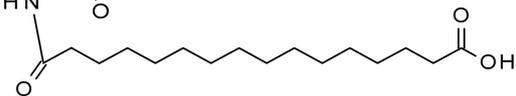


30



35

40

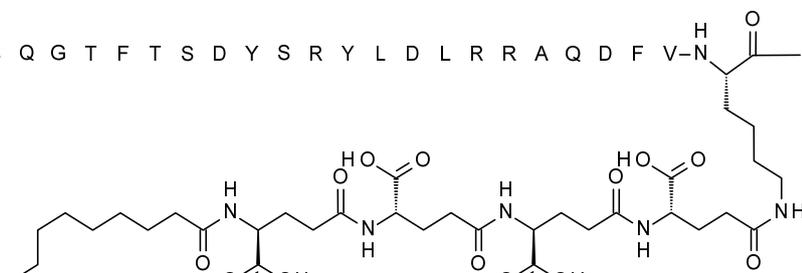


Sustancia química 86:

45

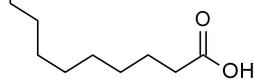


50



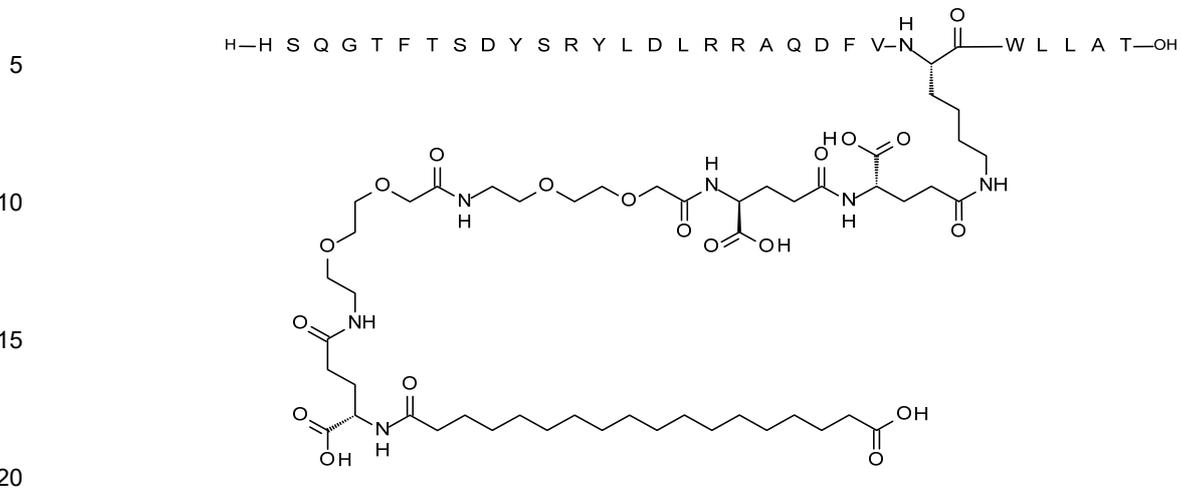
55

60

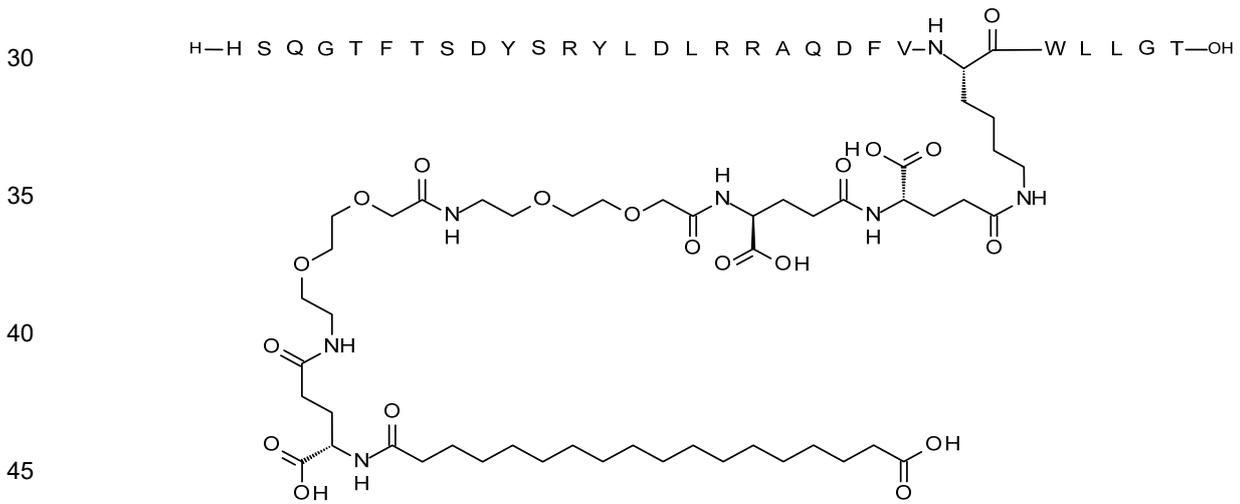


Sustancia química 87:

65



Sustancia química 88:



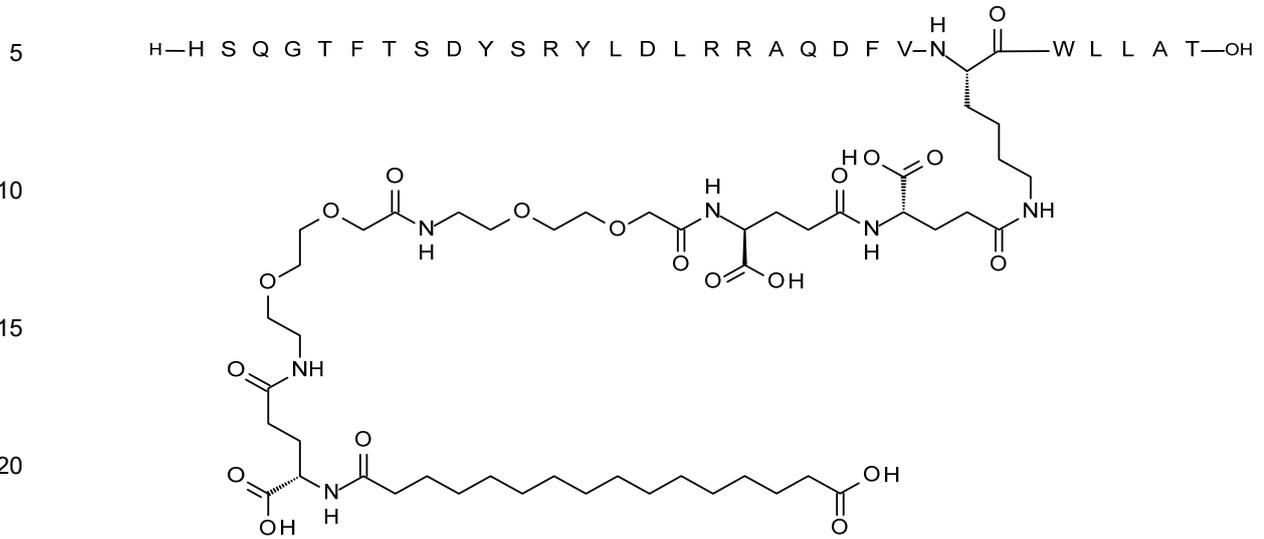
Sustancia química 89:

50

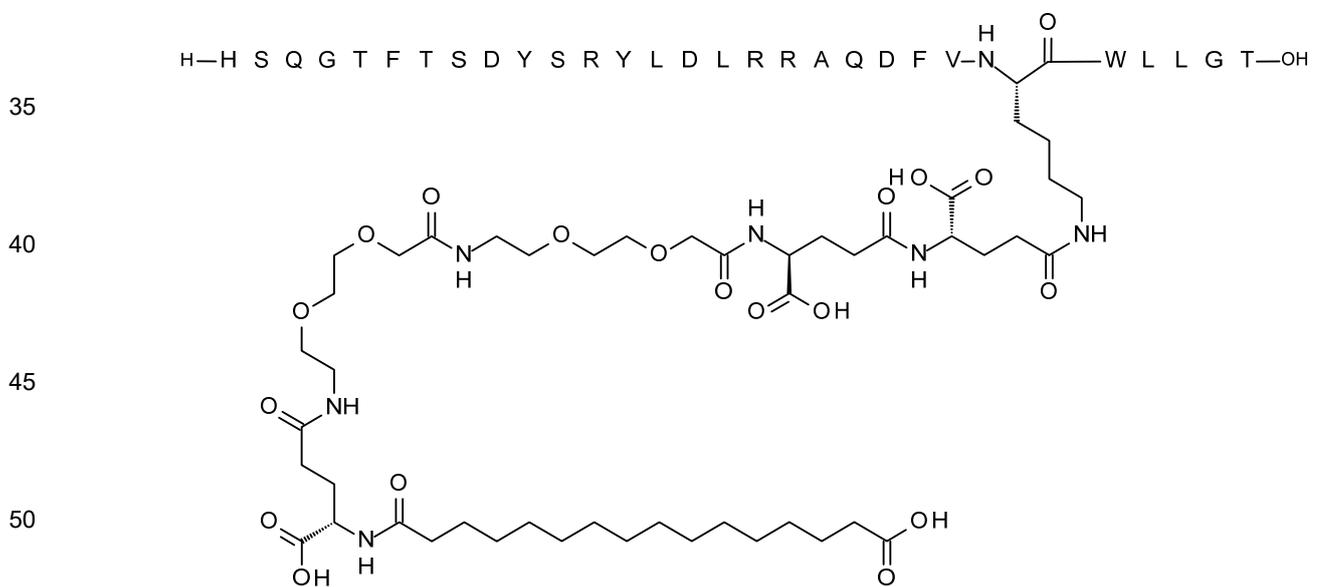
55

60

65



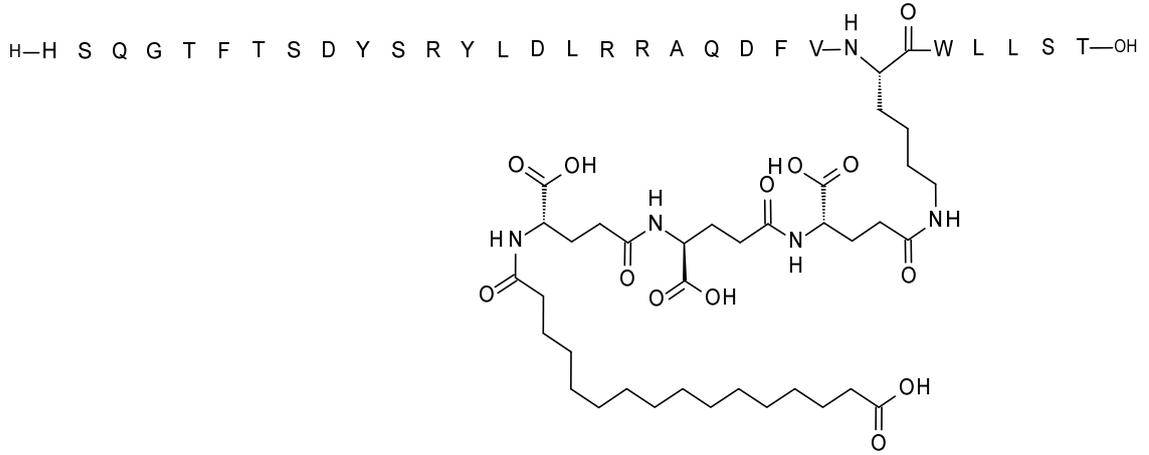
Sustancia química 90:



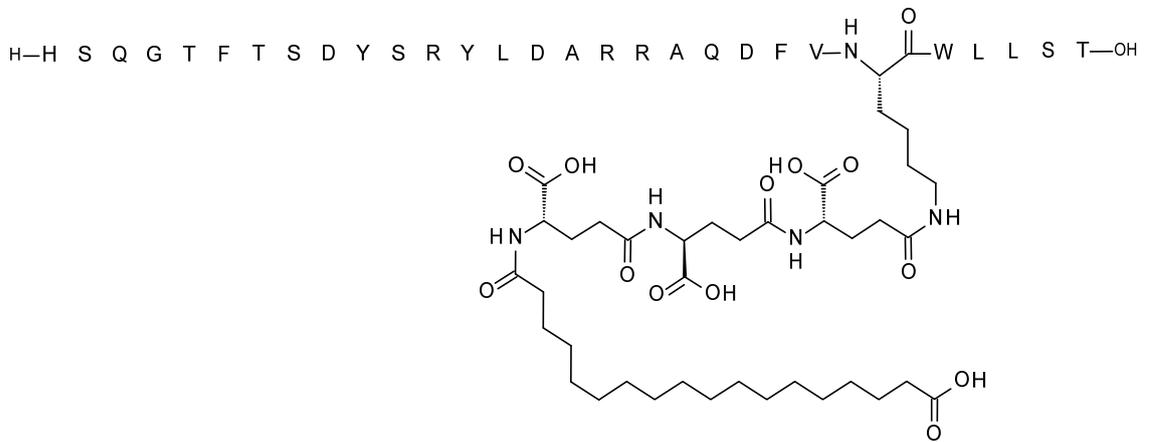
Sustancia química 91:

60

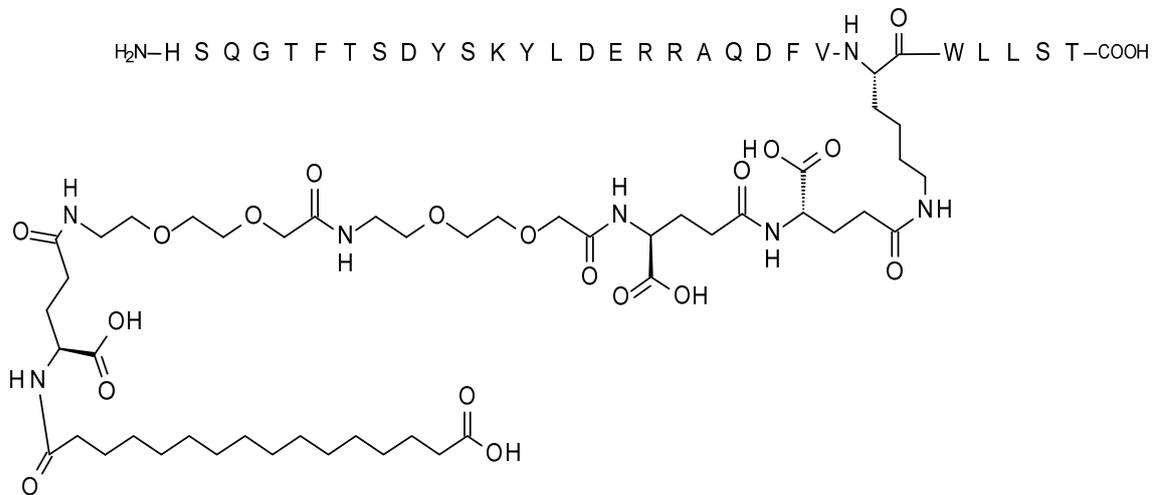
65



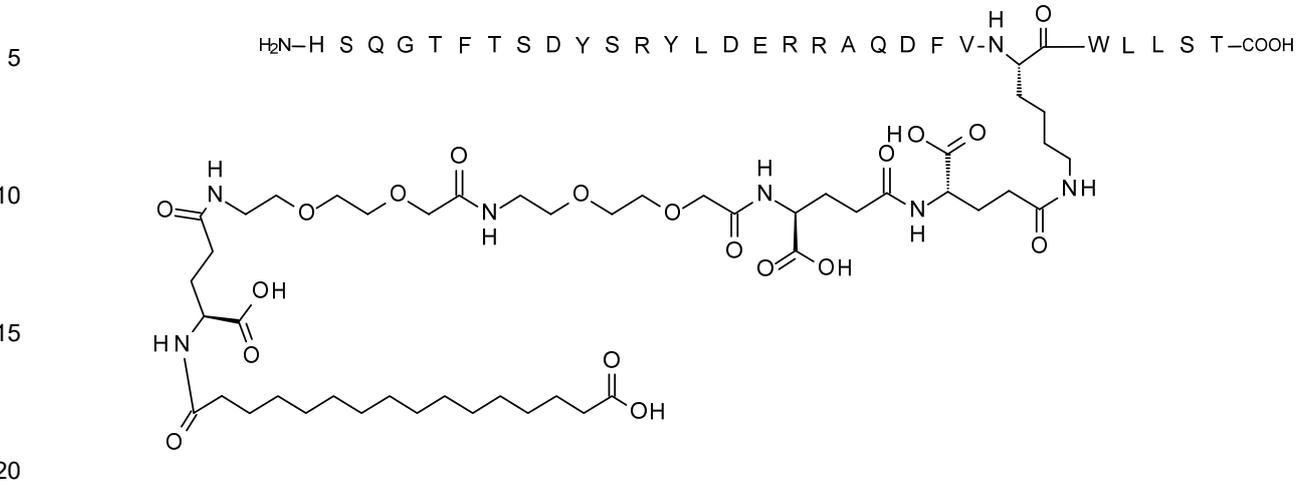
Sustancia química 92:



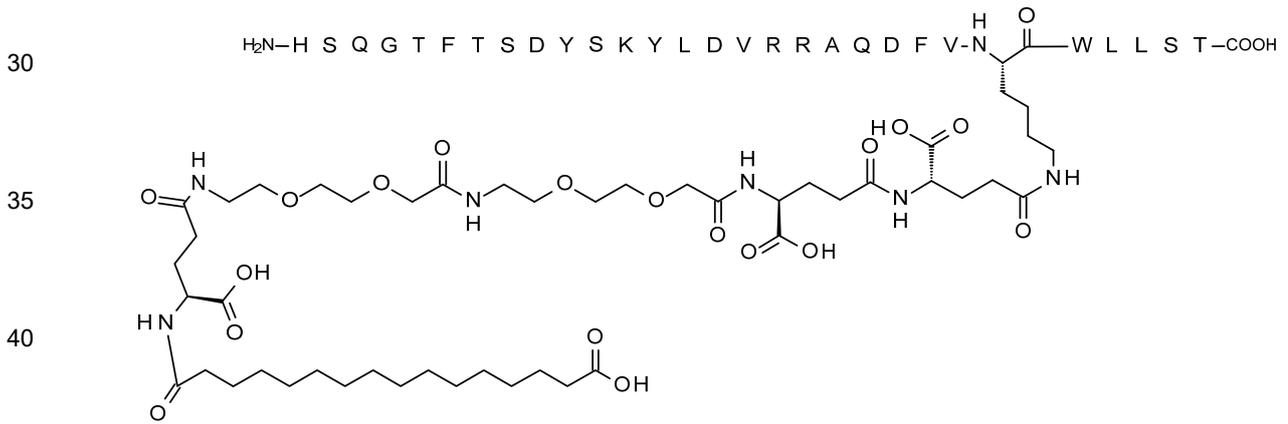
Sustancia química 93:



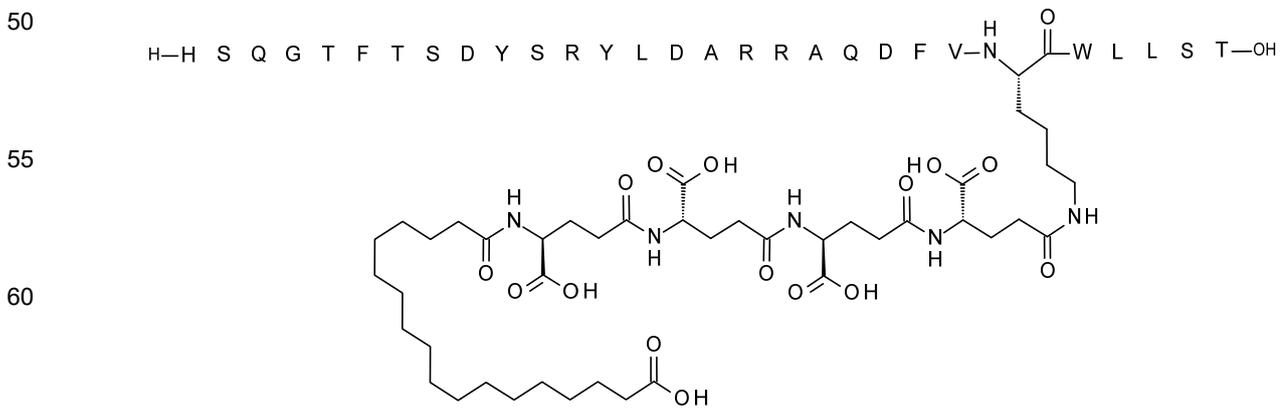
Sustancia química 94:



Sustancia química 95:

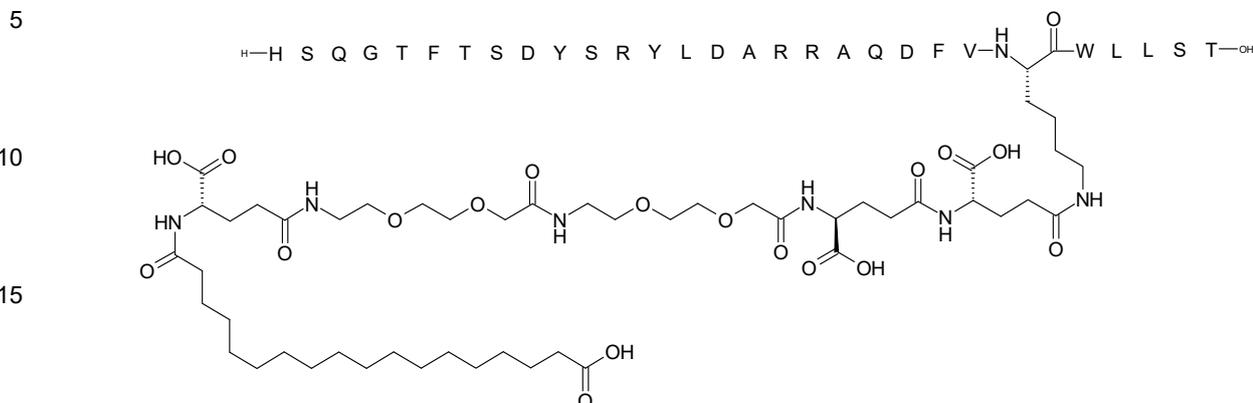


Sustancia química 96:



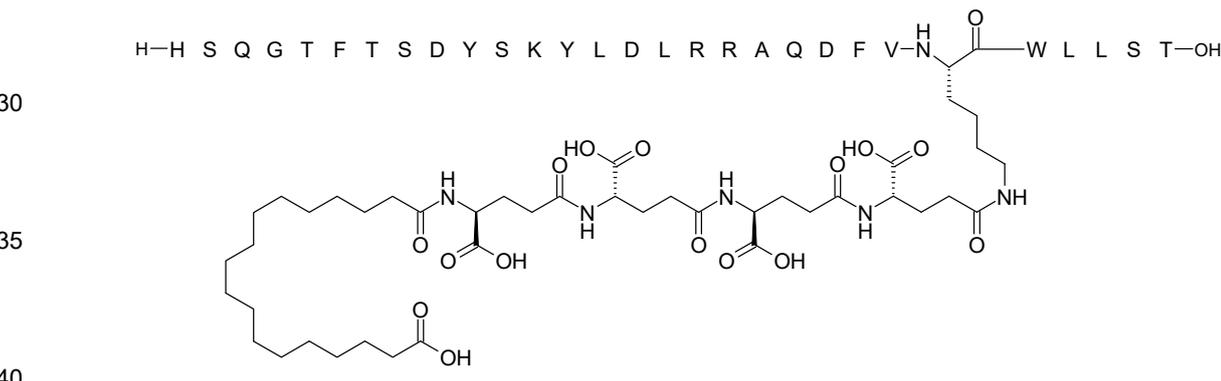
o Sustancia química 97:

Nε24-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Arg12,Ala16,Lys24,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón



12. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que tiene la estructura:

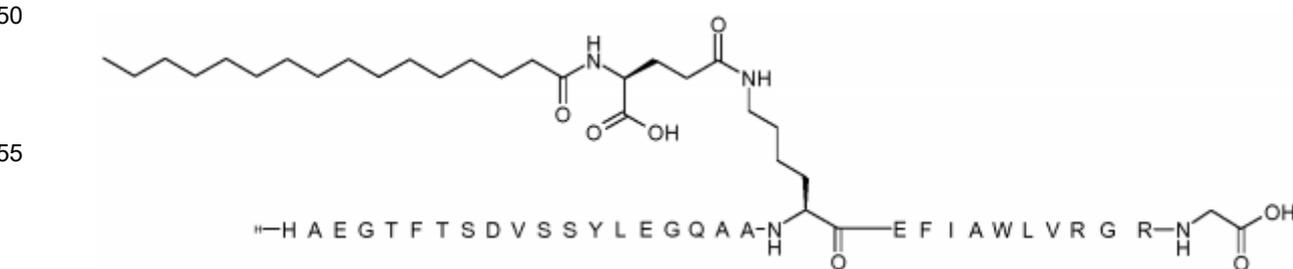
Nε24-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Leu16,Lys24,Leu27,Ser28]-Glucagón



13. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho péptido de glucagón está en combinación con un compuesto de GLP-1, un compuesto insulínico o exendina-4.

14. El péptido de glucagón en la combinación de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho compuesto de GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos G1 y G3:

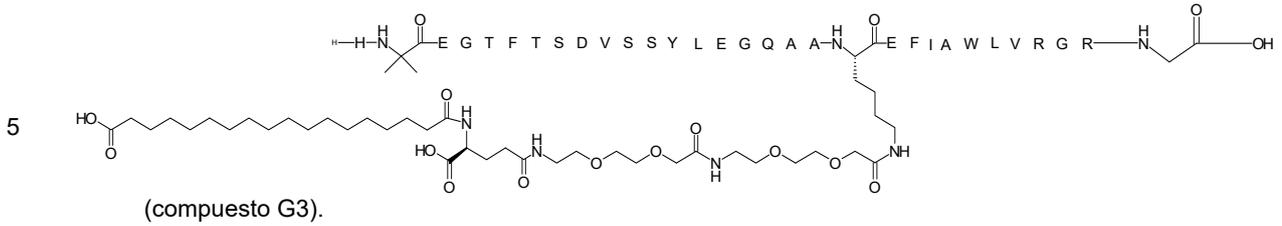
N-épsilon26-((S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butiril)[Arg34]GLP-1-(7-37):



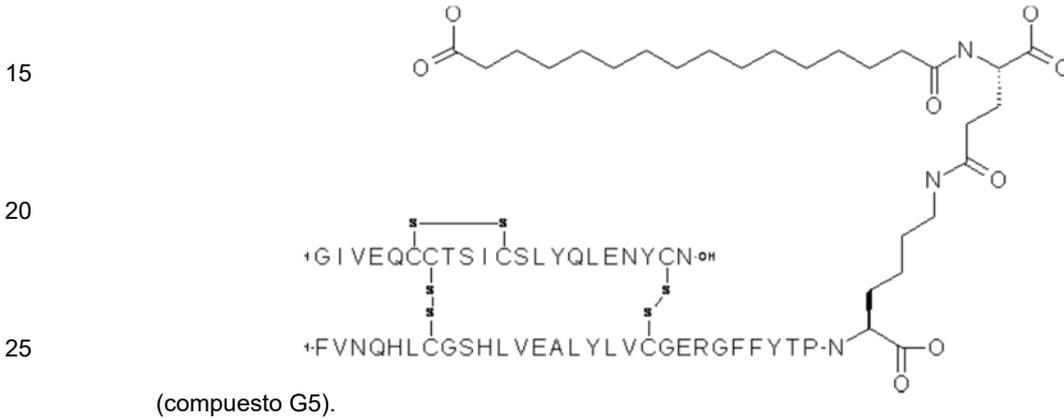
(compuesto G1); y

N-épsilon26-[2-(2-[2-[2-(2-{[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37):

65



- 10 15. El péptido de glucagón en la combinación de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el compuesto insulínico es el compuesto G5: insulina humana NεB29-hexadecandioil-γ-Glu-(desB30)



- 30 16. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 35 17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además uno o más compuestos o sustancias activas terapéuticamente adicionales.
- 40 18. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16-17, que es adecuada para la administración parenteral.
19. Un péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o el péptido de glucagón en la combinación de acuerdo con las reivindicaciones 13-15 para su uso en la terapia.

Efecto de los análogos de glucagón sobre el peso corporal en ratas DIO

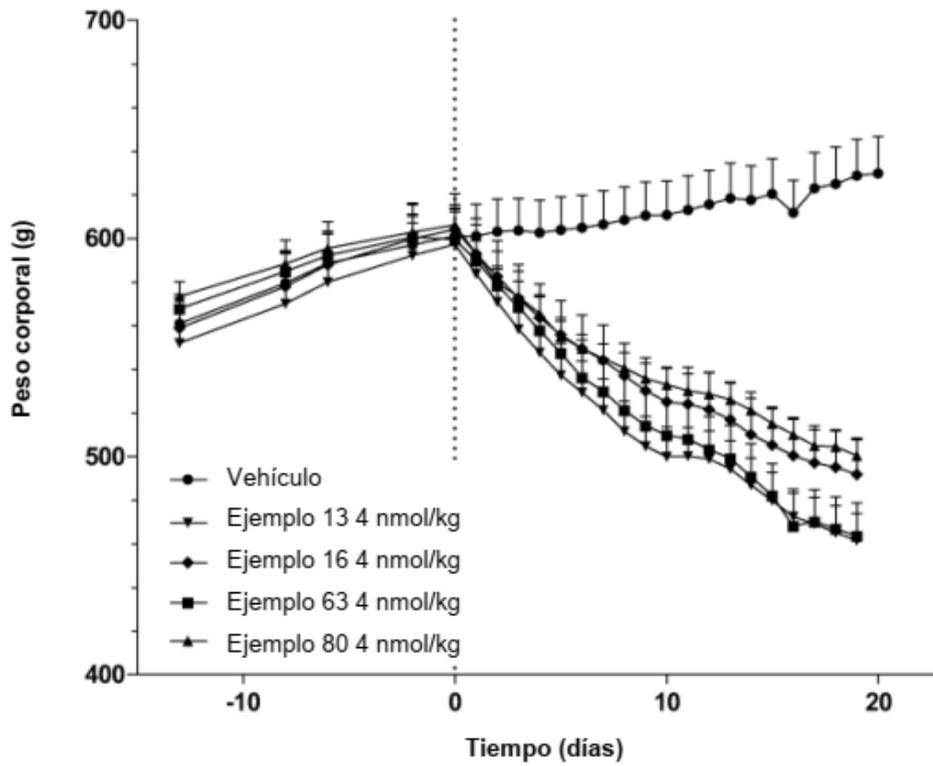


Fig. 1/1