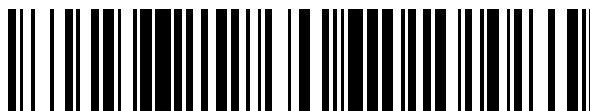


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 599**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/605** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/EP2013/059112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13721652 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2846823**

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

30 Prioridad:

**08.05.2012 EP 12167091**  
**14.05.2012 US 201261646470 P**  
**06.09.2012 EP 12183246**  
**06.09.2012 US 201261741770 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.07.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOFOED, JACOB;**  
**GARIBAY, PATRIC y**  
**LAU, JESPER**

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 2 770 599 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Derivados de GLP-1 doble-acilados

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), más en particular a derivados de GLP-1 doble-acilados en K<sup>26</sup> y en K<sup>37</sup>, y sus usos farmacéuticos.

10 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad del documento EP 12167091.3, presentado el 08 de mayo de 2012, y el documento EP 12183246.3, presentado el 06 de septiembre de 2012. También reivindica el beneficio de la solicitud provisional de la patente de los Estados Unidos con núm. de serie 61/646470, presentada el 14 de mayo de 2012, y la solicitud provisional de la patente de los Estados Unidos con núm. de serie 61/741770, presentada el 06 de septiembre de 2012.

Incorporación como referencia del listado de secuencias

20 El listado de secuencias, titulado "LISTADO DE SECUENCIAS", es de 568 bytes, se creó el 16 de abril de 2013.

Antecedentes de la invención

25 La revista Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, p. 1664-669 describe los derivados de GLP-1(7-37) que están doble-acilados en K<sup>26,34</sup>.

El documento WO 2011/080103 A1 describe un número de derivados de GLP-1 doble-acilados en K<sup>26</sup> y en K<sup>37</sup>.

30 El documento WO 99/43706 A1 describe un número de derivados de GLP-1 mono- y doble-acilados.

El documento WO 98/08871 A1 describe un número de derivados de GLP-1 que incluyen algunos que están doble-acilados.

Breve descripción de la invención

35 La invención se refiere a derivados de péptidos GLP-1.

40 La liraglutida es un derivado de GLP-1 mono-acilado para una administración una vez al día, que se comercializa desde 2009 por Novo Nordisk A/S. Este compuesto también se describe en el documento WO 98/08871 A1 (Ejemplo 37).

45 El documento WO 06/097537 A2 describe, entre otros derivados de GLP-1, la semaglutida (Ejemplo 4), que es un derivado de GLP-1 mono-acilado para administrar una vez a la semana que se encuentra en desarrollo por Novo Nordisk A/S.

50 Los derivados de la invención se acilan en una lisina sustituida por la glicina nativa en la posición 37, así como también en la lisina nativa en la posición 26. Las cadenas laterales son porciones de unión a albúmina. Estas comprenden una porción de prolongación, preferentemente que se selecciona de diácidos grasos y ácidos grasos con un grupo fenoxi distal, todos opcionalmente sustituidas. Un grupo carboxi del ácido graso o diácido graso se acila, opcionalmente mediante un conector, a un residuo de lisina del péptido GLP-1, preferentemente en el grupo épsilon amino de este.

55 El péptido GLP-1 puede ser un análogo de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) que tiene un total de hasta ocho diferencias de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), por ejemplo una o más adiciones, una o más deleciones y/o una o más sustituciones.

60 Más en particular, la invención se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, cada uno mediante un conector, en donde la porción de prolongación se selecciona del Quím. 1: HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-CO-\* y el Quím. 2: HOOC-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-CO-\*, en el que x es un número entero en el intervalo de 8-16 y y es un número entero en el intervalo de 6-13; y cada conector comprende el Quím. 3a: \*-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-CH[(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>]-CO-\*, que se conecta en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente un radical de hidrógeno (\*-H) o metil (\*-CH<sub>3</sub>), y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.

La invención se refiere, además, a tal derivado para el uso como un medicamento, en particular para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.

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

La invención se refiere además a un compuesto intermedio en forma de un compuesto protegido novedoso (Quím. 63, Ejemplo 43) que puede usarse en la síntesis de los compuestos de los Ejemplos 29 y 37 en la presente descripción y compuestos similares.

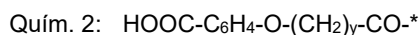
Los derivados de la invención son biológicamente activos. Por ejemplo, son mucho más potentes y se unen mucho mejor al receptor de GLP-1 en comparación con su respectivo compuesto comparador directo que difiere solamente en el conector. Además, o alternativamente, tienen un perfil farmacocinético prolongado. Además, o alternativamente, tienen una alta biodisponibilidad oral. Estas propiedades son de importancia en el desarrollo de compuestos de GLP-1 de nueva generación para administración subcutánea, intravenosa y/o en particular oral.

## Descripción

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

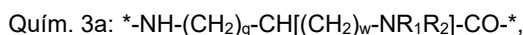
Un asterisco (\*) en una fórmula química designa i) un punto de unión, ii) un radical, y/o iii) un electrón no compartido.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un derivado de un análogo de GLP-1, cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a una posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a una posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, en donde la porción de prolongación se selecciona del Quím. 2 y el Quím. 1:



en donde x es un número entero en el intervalo de 8-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 6-13; y

el conector comprende el



que se conecta en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente \*-H o \*-CH<sub>3</sub>, y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.

## Análogos de GLP-1

El término "análogo GLP-1" o "análogo de GLP-1" como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido, o a un compuesto, que es una variante del péptido similar al glucagón tipo 1 humano (GLP-1(7-37)), la secuencia del cual se incluye en el listado de secuencias como la SEQ ID NO: 1. El péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 puede denominarse, además, como GLP-1 "nativo".

En el listado de secuencias, el primer residuo aminoacídico de la SEQ ID NO:1 (histidina) se le asigna el núm. 1. Sin embargo, en lo siguiente, de acuerdo con la práctica establecida en la técnica, este residuo de histidina se denomina como núm. 7, y los residuos aminoacídicos posteriores se enumeran por consiguiente, terminando con la glicina núm. 37. Por lo tanto, generalmente, cualquier referencia en la presente descripción al número del residuo aminoacídico o un número de la 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 análogos de GLP-1 de los derivados de la invención pueden describirse por referencia i) al número del residuo aminoacídico en el GLP-1(7-37) nativo correspondiente al residuo aminoacídico que se cambia (es decir, la posición correspondiente en el GLP-1 nativo) y ii) al cambio real. Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura apropiada de los análogos.

Un ejemplo no limitante de un análogo de GLP-1 del derivado de la invención es un análogo que se cambia de manera que comprende un primer residuo de lisina en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37). El análogo de GLP-1 del derivado de la invención comprende además un residuo de lisina en una posición correspondiente a la posición 26 (la lisina nativa). La secuencia aminoacídica de este análogo es de cualquier otra manera idéntica a la de GLP-1 nativo, y este análogo puede en consecuencia designarse como K<sup>37</sup>-GLP-1(7-37). Esta designación representa la secuencia aminoacídica de GLP-1 nativo donde la glicina en la posición 37 se ha sustituido con lisina.

El análogo de GLP-1 que forma parte del derivado de la invención comprende un máximo de ocho cambios de aminoácidos cuando se compara con el GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1). En otras palabras, es un péptido GLP-1(7-37) en el cual se han cambiado un número de residuos aminoacídicos cuando se compara con el GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1). Estos cambios pueden representar, independientemente, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

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

Por ejemplo, el análogo [Aib<sup>8</sup>, Glu<sup>22</sup>, Gln<sup>34</sup>, Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37) designa un péptido GLP-1(7-37) que, cuando se compara con GLP-1 nativo, tiene las siguientes sustituciones: Sustitución de alanina en posición 8 con Aib ( $\alpha$ -ácido aminoisobutírico), de glicina en posición 22 con ácido glutámico, de lisina en posición 34 con glutamina, y de glicina en posición 37 con lisina. Este análogo también puede designarse brevemente (8Aib, 22E, 34Q, 37K), donde la referencia a GLP-1(7-37) está implícita.

Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, en comparación con la SEQ ID NO: 1.

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

Las expresiones "una posición equivalente a" o "posición correspondiente" pueden usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia de GLP-1(7-37) como referencia a GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como también la cantidad de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo, mediante simple escritura e inspección visual; y/o puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa align por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. Para el alineamiento, puede usarse la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 y la matriz de identidad predeterminada, y la penalización por el primer residuo en una interrupción puede fijarse en -12 o preferentemente en -10 y las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción en -2 o preferentemente en -0,5.

Un ejemplo de tal alineamiento se inserta a continuación, en cuya secuencia núm. 1 (SEQ\_ID\_NO\_1) es la SEQ ID NO: 1, y la secuencia núm. 2 (Análogo) es el análogo (8Aib, 22E, 34Q, 37K) de esta:

# Secuencias alineadas: 2

# 1: SEQ\_ID\_NO\_1

# 2: ANÁLOGO

# Matriz: EBLOSUM62

# Penalización\_interrupción: 10,0

# Penalización\_extendida: 0,5

#

# Longitud: 31

# Identidad: 27/31 (87,1 %)

# Similitud: 28/31 (90,3 %)

# Interrupciones: 0/31 (0,0 %)

# Puntuación: 137,0



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

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

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

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

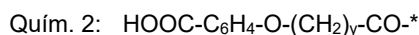
20 En una modalidad preferida, un éster activo de la porción de unión a albúmina, preferentemente que comprende una porción de prolongación y un conector, se une covalentemente a un grupo amino de un residuo de lisina, preferentemente el grupo épsilon amino de este, bajo la formación de un enlace amida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

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

25 Un derivado que comprende dos porciones de prolongación unidas a un primer y un segundo residuo de K (a saber, K<sup>26</sup> y K<sup>37</sup>) mediante un conector puede referirse a un derivado que se ha acilado dos veces, acilado doble, o doble-acilado a los grupos épsilon amino de los primeros y segundos residuos de lisina, por ejemplo en la posición 26 y 37, respectivamente, del péptido GLP-1.

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

35 En un aspecto, cada porción de prolongación comprende, o consiste en, una porción de prolongación, que se selecciona independientemente del Quím. 1 y el Quím. 2:



40 en donde x es un número entero en el intervalo de 8-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 6-13. En una modalidad,  $^*(\text{CH}_2)_x^*$  se refiere a alquileo lineal en el que x es un número entero en el intervalo de 8-16.

45 En una modalidad particular,  $^*(\text{CH}_2)_y^*$  se refiere a un alquileo lineal en el que y es un número entero en el intervalo de 6-13.

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

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

55 La nomenclatura es como es común en la técnica, por ejemplo en las fórmulas anteriores  $^*\text{-COOH}$  así como  $\text{HOOC}^*$  se refiere a carboxi,  $^*\text{-C}_6\text{H}_4^*$  a fenileno y  $^*\text{-CO}^*$  así como también  $^*\text{-OC}^*$  a carbonilo ( $\text{O}=\text{C}^*\text{-}$ );  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-O}^*$  a fenoxilo. Además,  $\text{CO}^*$  se refiere a  $\text{C(=O)}^*$ . Por ejemplo, en cualquier fórmula ( $\text{R-CO}^*$ ) en la presente descripción (donde R es tal como se define por cada fórmula),  $\text{R-CO}^*$  se refiere a  $\text{R-C(=O)}^*$ . En modalidades particulares, los aromáticos, tales como los radicales fenoxilo y fenileno, pueden ser para.

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

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

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

En aún otra modalidad particular, los dos conectores son similares, preferentemente, idénticos sustancialmente, o con la máxima preferencia, idénticos.

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

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

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

20 Los ejemplos de huellas adecuadas incluyen, sin limitación, huellas UNITY, huellas MDL y/o huellas ECFP, tales como huellas ECFP\_6 (ECFP significa huellas de conectividad extendida).

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

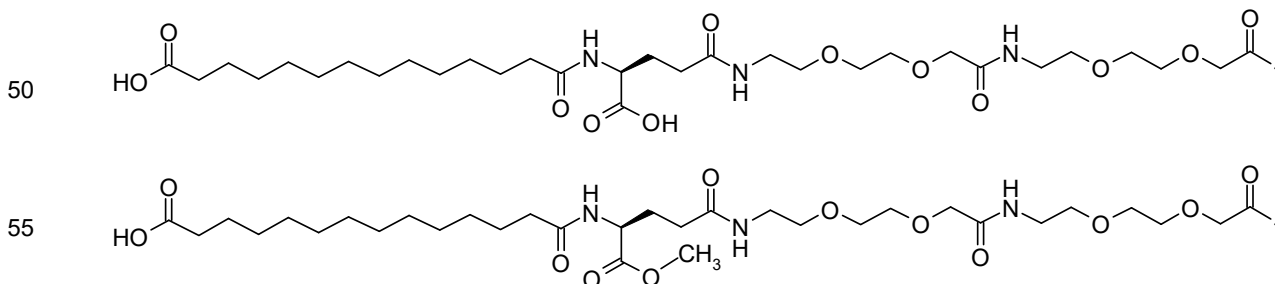
25 El coeficiente de Tanimoto se usa preferentemente para calcular la similitud de las dos huellas, se usa ya sea a), b), o c).

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

35 Las huellas UNITY pueden calcularse mediante el uso del programa SYBYL (disponible de Tripos, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319, EE.UU.). Las huellas ECFP\_6 y MDL pueden calcularse mediante el uso del programa Pipeline Pilot (disponible de Accelrys Inc., 10188 Telesis Court, Suite 100, San Diego, CA 92121, EE.UU.).

40 Para más detalles, ver, por ejemplo, J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 542-549; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004, 44, 170-178; J. Med. Chem. 2004, 47, 2743-2749; J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 742-754; así como también SciTegic Pipeline Pilot Chemistry Collection: Basic Chemistry User Guide, marzo de 2008, SciTegic Pipeline Pilot Data Modeling Collection, 2008 - ambos de Accelrys Software Inc., San Diego, Estados Unidos y las guías [http://www.tripos.com/tripos\\_resources/fileroot/pdfs/Unity\\_111408.pdf](http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/Unity_111408.pdf) y [http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL\\_072505.pdf](http://www.tripos.com/data/SYBYL/SYBYL_072505.pdf).

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



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

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

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

Cada uno de los dos conectores del derivado de la invención comprende el siguiente primer elemento conector (A):  
 Quím. 3a:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}[(\text{CH}_2)_w-\text{NR}_1\text{R}_2]-\text{CO}-^*$ , que se conecta en su extremo  $\text{CO}-^*$  al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente  $^*-\text{H}$  (un radical de hidrógeno), o  $^*-\text{CH}_3$  (metilo), y w es un número entero en el intervalo de 0-5.

Un ejemplo no limitante de un conector que comprende este primer elemento conector del Quím. 3a es lisina, o un dirradical de lisina. La lisina puede usarse preferentemente como conector en su versión omega, donde omega se refiere al hecho de que es el grupo amino en el átomo de C distal de la cadena sustituyente de alquilo que se radica (a  $^*-\text{NH}$ ). Para lisina la posición omega se refiere, generalmente en la presente descripción, a la posición épsilon (el átomo alfa es el átomo de C próximo a la función del ácido carboxílico, y cada átomo de C ascendente se designa luego mediante el uso de las letras griegas posteriores beta, gamma, delta, y así sucesivamente, hasta que se alcanza el átomo de C al cual se une el grupo  $^*-\text{NH}$ , y en el caso de la lisina el átomo épsilon). En consecuencia, cuando w=0, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> ambos representan  $^*-\text{H}$ , y q = 4, la fórmula del Quím. 3a se refiere a un dirradical de épsilon-lisina (eps-Lys; Quím. 6).

Otro ejemplo no limitante de un conector que comprende este primer elemento conector del Quím. 3a es N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-dimetil lisina, o un dirradical de este residuo (6-amino-(S)-2-(dimetilamino)hexanoilo). Además N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-dimetil lisina puede usarse preferentemente como conector en su versión omega, donde omega se refiere al hecho de que es el grupo amino en el átomo de C distal de la cadena sustituyente alquilo que se radica (a  $^*-\text{NH}$ ). Además para N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-dimetil lisina, la posición omega se refiere, generalmente en la presente descripción, a la posición épsilon (el átomo alfa es el átomo de C próximo a la función de ácido carboxílico, y cada átomo de C ascendente se designa entonces mediante el uso de las letras griegas posteriores beta, gamma, delta, y así sucesivamente, hasta que se alcanza el átomo de C al cual se une el grupo  $^*-\text{NH}$ , y en el caso de N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-dimetil lisina el átomo épsilon). En consecuencia, cuando w = 0, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> ambos representan  $^*-\text{CH}_3$ , y q = 4, la fórmula del Quím. 3a se refiere a un dirradical de N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-dimetil épsilon lisina (en breve "N,N-dimetil-eps-Lys", Quím. 6a).

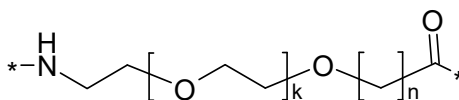
En una modalidad preferida, este primer elemento conector está en su forma L.

El conector puede comprender 1 o 2 veces el Quím. 3a. Cuando z es 2 los elementos del Quím. 3a se interconectan preferentemente a través de un enlace amida. Por ejemplo, el conector puede comprender dos veces épsilon-Lys (2xeps-Lys; 2xQuím. 6).

El conector (cada uno del primero y segundo conector) puede además (es decir, además de uno o dos veces el primer elemento conector (A)) comprender uno o más elementos conectores adicionales, por ejemplo, elementos conectores que se seleccionan independientemente de los segundo (B), tercero (C), cuarto (D), quinto (E) y/o sexto (F) elementos conectores, como se define a continuación:

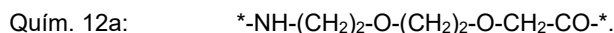
Un segundo elemento conector (B):

Quím. 12:



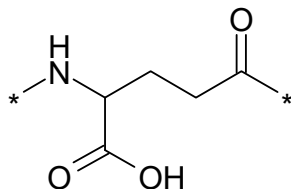
en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

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



Un tercer elemento conector (C), ácido gamma-glutámico (gGlu):

Quím. 14:





El gamma-Glu (gGlu) es el grupo gamma carboxi del aminoácido ácido glutámico que se usa para la conexión a otro elemento conector, o al grupo épsilon amino de la lisina.

Un cuarto elemento conector (D), un dirradical de ácido amino octanoico (Aoc):

Quím. 15:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-^*$ .

Un quinto elemento conector (E), que es un dirradical del aminoácido serina (Ser).

Un sexto el elemento conector (F), que es un dirradical del aminoácido glicina (Gly).

En una modalidad particular no limitante, cada conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo  $^*-\text{NH}$  al extremo  $\text{CO}-^*$  de la porción de prolongación y en su extremo  $\text{CO}-^*$  al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.

Por ejemplo, el primer conector consiste en (Quím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo  $^*-\text{NH}$  al extremo  $\text{CO}-^*$  de la primera porción de prolongación, y en su extremo  $\text{CO}-^*$  al grupo épsilon amino del primer residuo de K del análogo de GLP-1, y el segundo conector consiste en (Quím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo  $^*-\text{NH}$  al extremo  $\text{CO}-^*$  de la segunda porción de prolongación, y en su extremo  $\text{CO}-^*$  al grupo épsilon amino del segundo residuo de K del análogo de GLP-1.

De más está decir, solo para el buen orden: Aquí y en lo que sigue la frase "en la secuencia indicada" significa que el extremo  $^*-\text{NH}$  del primer elemento conector mencionado (aquí Quím. 14) se conecta al extremo  $\text{CO}-^*$  del prolongador y el extremo  $\text{CO}-^*$  del último elemento conector mencionado (aquí el último de las dos veces Quím. 6) se conecta al grupo épsilon amino del residuo de K en cuestión del análogo de GLP-1.

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

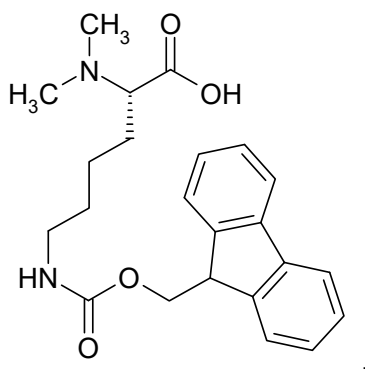
La concentración plasmática de los derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse mediante el uso de cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse LC-MS (Espectroscopía de Masas acoplada a Cromatografía Líquida), o inmunoensayos tales como RIA (Radio Inmuno Ensayo), ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzimas) y LOCI (Inmunoensayo de Luminiscencia de Canalización de Oxígeno). Los protocolos generales para ensayos RIA y ELISA adecuados se encuentran en, por ejemplo, el documento WO09/030738 en las pág. 116-118. Un ensayo preferido es el ensayo LOCI, por ejemplo, descrito en el Ejemplo 48 en la presente descripción.

#### Productos Intermedios

También se describe un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (iix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; o (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii), (v), (vii), (iix), o (ix).

También se describe un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 que se selecciona de los siguientes análogos de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (iix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; y (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii), (v), (vi), (vii), (iix), o (ix).

También se describe un producto intermedio en forma de un compuesto conector protegido novedoso que puede usarse en la síntesis de los compuestos de los Ejemplos 29 y 37 en la presente descripción y compuestos similares, específicamente el compuesto ácido (S)-2-Dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonamino)-hexanoico con la estructura del Quím. 63:



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

#### Sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente

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

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

La sal puede ser una sal básica, una sal ácida, o puede no ser ninguna de estas (es decir una sal neutra). En agua, las sales básicas producen iones hidróxido y las sales ácidas iones hidronio.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Propiedades funcionales

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

tienen una alta biodisponibilidad oral. Además, o alternativamente, el número de mutaciones en el análogo de GLP-1 es bajo.

#### Actividad biológica (potencia)

5 De acuerdo con el primer aspecto, los derivados de la invención, así como también los péptidos GLP-1 constituyentes como tal (tales como K<sup>37</sup>-GLP-1(7-37) o análogos de estos), son biológicamente activos o potentes. Por ejemplo, los derivados de la invención son mucho más potentes que su respectivo compuesto comparador directo que difiere solamente en el conector.

10 Más particularmente, el elemento conector del Quím. 3a ha demostrado ser, sorprendente e inesperadamente, superior en comparación con los elementos conectores conocidos cuando se trata de la actividad biológica o potencia de los derivados de GLP-1 que incorporan este elemento conector.

15 Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 50 en la presente descripción, cuando un conector que consiste en (Quím. 14-2xQuím.6), o (Quím.14-2xQuím.6a), se usa en lugar del conector "gGlu-2xOEG" (Quím. 14-2xQuím. 13), que se establece bien en la técnica y se reconoce como un conector excelente, los derivados de GLP-1 de la presente invención son, sorprendente e inesperadamente, mucho más potentes en comparación con los mejores derivados de GLP-1 de última generación.

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

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

30 Por ejemplo, las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable que expresa el receptor de GLP-1 humano pueden estimularse con el derivado o análogo de GLP-1 en cuestión, y la potencia de la producción de AMPc medida, por ejemplo, en base a la competencia entre el AMPc formado endógenamente y el AMPc marcado con biotina añadido exógenamente, que puede capturarse mediante el uso de un anticuerpo específico, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 44.

35 También, o alternativamente, la respuesta del receptor de GLP-1 humano puede medirse en un ensayo de gen reportero, por ejemplo, en una línea celular BHK transfectada establemente que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta al AMPc (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (luciferasa CRE). Cuando se produce AMPc como resultado de la activación del receptor de GLP-1, esto a su vez resulta en la expresión de la luciferasa. La luciferasa puede determinarse mediante la adición de luciferina, que se convierte por la enzima en oxiluciferina y produce bioluminiscencia, que se mide y es una medida de la potencia in vitro. Un ejemplo no limitante de tal ensayo se describe en el Ejemplo 45.

40 El término concentración eficaz semimáxima (EC<sub>50</sub>) se refiere generalmente a la concentración que induce la mitad de una respuesta entre el valor basal y el máximo, en referencia a la curva de respuesta a la dosis. EC<sub>50</sub> se usa como una medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración donde se observa el 50 % de su efecto máximo.

45 La potencia in vitro de los derivados de la invención puede determinarse como se describió anteriormente y determinarse la EC<sub>50</sub> del derivado en cuestión. A menor valor de EC<sub>50</sub>, mejor será la potencia.

50 En una modalidad particular, el derivado de la invención tiene una potencia in vitro correspondiente a una EC<sub>50</sub> de o por debajo de 10 000 pM, con mayor preferencia por debajo de 5000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 1000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 500 pM (por ejemplo, determinado como se describe en el Ejemplo 44).

55 En aún otra modalidad particular, el derivado de la invención tiene una potencia correspondiente a una EC<sub>50</sub> en HSA al 0 % por debajo de 400 pM, preferentemente, por debajo de 300 pM, con mayor preferencia, por debajo de 200 pM, o incluso con mayor preferencia, por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM (por ejemplo, determinado como se describe en el Ejemplo 45).

60 Además, o alternativamente, la capacidad de los derivados de la invención de unirse al receptor de GLP-1 puede medirse, y, si es relevante, usarse como una medida de la actividad de GLP-1 (afinidad por el receptor). Esta capacidad puede determinarse como se describe en el Ejemplo 46. Generalmente, la unión al receptor de GLP-1 a baja concentración de albúmina deber ser tan buena como sea posible, lo que corresponde a un valor de IC<sub>50</sub> bajo. En modalidades particulares, el valor de IC<sub>50</sub> de un derivado de la invención, en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja), está por debajo del valor de IC<sub>50</sub> correspondiente a la semaglutida, preferentemente por debajo de 90 % de esta, con mayor preferencia por debajo de 80 % de esta, incluso con mayor preferencia por debajo de 70 % de esta, o con la máxima preferencia por debajo de 50 % de esta.

65

Por ejemplo, los derivados de la invención son mucho más potentes que su respectivo compuesto comparador directo que difiere solamente en el conector.

5 Más particularmente, el elemento conector del Quím. 3a ha demostrado ser, sorprendente e inesperadamente, superior en comparación con los elementos conectores conocidos cuando se trata de la unión al receptor de GLP-1 de los derivados de GLP-1 que incorpora este elemento conector.

10 Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 50 en la presente descripción, cuando un conector que consiste en (Quím. 14-2xQuím.6), o (Quím.14-2xQuím.6a), se usa en lugar del conector "gGlu-2xOEG" (Quím. 14-2xQuím. 13), que se establece bien en la técnica y se reconoce como un conector excelente, los derivados de GLP-1 de la presente invención tienen, sorprendente e inesperadamente, una unión mucho mejor al receptor de GLP-1 en comparación con los mejores derivados de GLP-1 de última generación.

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

20 El ratón diabético db/db es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y el efecto de disminución de glucosa en sangre, y/o el efecto de disminución del peso corporal pueden determinarse en dichos ratones in vivo, para el efecto de disminución del peso corporal preferentemente después de una administración aguda.

25 El cerdo LYD es otro ejemplo de un modelo animal adecuado y la reducción de la ingesta de alimentos puede determinarse en un estudio PD en tales cerdos in vivo, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 49. Los derivados de la invención son muy potentes in vivo, lo que se evidencia por una buena reducción en la ingesta de alimentos en este estudio de PD en los cerdos.

#### Prolongación - unión al receptor / albúmina baja y alta

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

30 La capacidad de los derivados de la invención de unirse al receptor de GLP-1 en presencia de una concentración baja y una alta de albúmina, respectivamente, puede determinarse como se describe en el Ejemplo 46.

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

40 El valor de IC<sub>50</sub> a concentración alta de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Como se conoce, los derivados de GLP-1 también se unen a la albúmina. Este es un efecto conveniente generalmente, que extiende su permanencia en el plasma. Por lo tanto, el valor de IC<sub>50</sub> a albúmina alta será mayor generalmente que el valor de IC<sub>50</sub> a albúmina baja, lo que corresponde a una unión reducida al receptor de GLP-1, provocada por la unión a la albúmina que compite con la unión al receptor de GLP-1.

#### Prolongación - vida media in vivo

45 De acuerdo con el segundo aspecto, los derivados de la invención se prolongan. La prolongación puede determinarse como la vida media terminal (T<sub>½</sub>) in vivo en ratas después de la administración i.v., como se describe en el Ejemplo 48. En modalidades particulares, la vida media en rata es al menos 10 horas, preferentemente al menos 15 horas, con mayor preferencia al menos 20 horas, incluso con mayor preferencia al menos 25 horas o con la máxima preferencia al menos 30 horas.

50 O, la prolongación puede determinarse en otras especies de animales, por ejemplo como la vida media terminal (T<sub>½</sub>) in vivo en minicerdos después de la administración i.v., como se describe en el Ejemplo 47. En modalidades particulares, la vida media terminal en minicerdos es al menos 8 horas, preferentemente al menos 24 horas, aún con mayor preferencia al menos 40 horas, incluso con mayor preferencia al menos 60 horas, o con la máxima preferencia al menos 80 horas.

55 Sorprendentemente, los presentes inventores identificaron una nueva clase de derivados de GLP-1, objetos de la presente invención, que tienen una alta potencia y a la misma vez preferentemente una larga vida media.

#### Biodisponibilidad oral

60 De acuerdo con el tercer aspecto, los derivados de la invención tienen una alta biodisponibilidad oral.

65 La biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 comerciales es muy baja. La biodisponibilidad oral de los derivados de GLP-1 en desarrollo para la administración i.v. o s.c. es muy baja.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de derivados de GLP-1 de una biodisponibilidad oral mejorada. Tales derivados podrían ser candidatos adecuados para administración oral, siempre que su potencia sea generalmente satisfactoria y/o siempre que su vida media también sea generalmente satisfactoria.

5 Generalmente, el término biodisponibilidad se refiere a la fracción de una dosis administrada de un ingrediente farmacéutico activo (API), tal como un derivado de la invención que alcanza la circulación sistémica sin cambiar. Por definición, cuando un API se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es del 100 %. Sin embargo, cuando se administra a través de otras vías (tales como por vía oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a la degradación y/o absorción incompleta y al metabolismo de primer paso). El conocimiento sobre la biodisponibilidad es importante cuando se calculan las dosificaciones para vías de administración no intravenosas.

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

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

25 En una modalidad particular, el derivado de la invención tiene una biodisponibilidad oral absoluta que es superior a la de la semaglutida, preferentemente al menos 10 % superior, con mayor preferencia al menos 20 % superior, incluso con mayor preferencia al menos 30 % superior, o con la máxima preferencia al menos 40 % superior. En las modalidades particulares adicionales, este tiene una biodisponibilidad oral absoluta que es al menos 1,5 veces la de la semaglutida, preferentemente al menos 2,0 veces, con mayor preferencia al menos 3,0 veces, incluso con mayor preferencia al menos 4,0 veces, o con la máxima preferencia al menos 5,0 veces la de la semaglutida.

30 Antes de analizar la biodisponibilidad oral los derivados de la invención pueden formularse adecuadamente como se conoce en la técnica de las formulaciones orales de compuestos insulínotropicos, por ejemplo mediante el uso de cualquiera de una o más de las formulaciones descritas en el documento WO 2008/145728.

35 En una modalidad particular, los derivados de la invención tienen una buena estabilidad gastrointestinal. La estabilidad gastrointestinal puede determinarse in vitro, mediante la incubación del derivado con un extracto diluido adecuadamente del sistema gastrointestinal de los seres humanos, o de una especie animal relevante tal como minicerdo, cerdo LYD, perro, o rata, en condiciones fisiológicamente relevantes, y durante un período de tiempo fisiológicamente importante. La estabilidad puede mejorarse adicionalmente cuando el derivado se combina con uno o más inhibidores de enzima relevantes, en una cantidad eficaz. La estabilidad gastrointestinal in vitro puede medirse mediante el uso de métodos estándares conocidos en la técnica. La estabilidad gastrointestinal de los derivados de la invención se mejora preferentemente en comparación con la semaglutida, y/o en comparación con el derivado del Ejemplo 2 del documento WO 2011/080103 A1. El derivado de la invención es preferentemente al menos tan estable como uno cualquiera o ambos de estos dos compuestos comparativos, preferentemente la estabilidad se mejora en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, o al menos 50 %; con mayor preferencia en al menos 75 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 175 %, o al menos 200 %, en comparación con la estabilidad de cualquiera de estos dos compuestos comparativos.

#### Propiedades biofísicas

50 De acuerdo con el cuarto aspecto, los derivados de la invención tienen buenas propiedades biofísicas. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan, a estabilidad física y/o solubilidad. Estas y otras propiedades biofísicas pueden medirse mediante el uso de métodos estándar conocidos en la técnica de la química de proteínas. En una modalidad particular, estas propiedades se mejoran en comparación con el GLP-1 nativo (SEQ ID NO: 1). El cambio de las propiedades oligoméricas de los derivados puede ser al menos parcialmente responsable de las propiedades biofísicas mejoradas.

Las modalidades particulares adicionales de los derivados de la invención se describen en las secciones tituladas "MODALIDADES PARTICULARES" y "MODALIDADES PARTICULARES ADICIONALES" antes de la sección experimental.

#### 60 Procesos de producción

La producción de péptidos tipo GLP-1(7-37) y análogos de GLP-1 es bien conocida en la técnica. La porción GLP-1 de los derivados de la invención, a saber, K<sup>37</sup>-GLP-1(7-37) o un análogo de este, puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos clásica, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida mediante el uso de los químicos t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, ver, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups

in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, "Organic Synthesis on solid Phase", Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000 y "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Editado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000.

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

10 Aquellos derivados de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o miméticos mono o dipeptídicos N-terminales unidos covalentemente pueden, por ejemplo, producirse como se describe en la parte experimental. O ver, por ejemplo, Hodgson y otros: "The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids", *Chemical Society Reviews*, vol. 33, núm. 7 (2004), p. 422-430; y el documento WO 2009/083549 A1 titulado "Semi-recombinant preparation of GLP-1 analogues".

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

20 Composiciones farmacéuticas

La composición farmacéutica que comprende un derivado de la invención o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este y un excipiente aceptable farmacéuticamente puede prepararse como se conoce en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Una composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico. El agente isotónico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un

alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y mezclas de estos. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, lo que incluye, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. El azúcar alcohólico se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol.

Una composición farmacéutica puede comprender un agente quelante. El agente quelante puede seleccionarse, por ejemplo, de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y mezclas de estos.

Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizante. El estabilizante puede ser por ejemplo uno o más inhibidores de la oxidación, inhibidores de la agregación, tensioactivos y/o uno o más inhibidores de proteasas.

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

Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad de una base de tipo aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el péptido durante el almacenamiento de la composición. El término "base de tipo aminoácido" se refiere a uno o más aminoácidos (tales como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), o análogos de estos. Cualquier aminoácido puede presentarse ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de estos) de la base de tipo aminoácido puede presentarse.

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 péptido es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L o D) o sus combinaciones.

Una composición farmacéutica puede comprender un estabilizante seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. El estabilizante puede seleccionarse, por ejemplo, de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxixelulosa o derivados de estos (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol y sales diferentes (por ejemplo, cloruro de sodio).

Una composición farmacéutica puede comprender agentes estabilizantes adicionales tales como, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido de la oxidación de la metionina y un tensioactivo no iónico, que protege al polipéptido de la agregación asociada a la congelación-descongelación o al cizallamiento mecánico.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más tensioactivos, por ejemplo, un tensioactivo, al menos un tensioactivo, o dos tensioactivos diferentes. El término "tensioactivo" se refiere a cualesquiera moléculas o iones que se comprenden de una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El tensioactivo puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos no iónicos y/o tensioactivos zwitteriónicos.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más inhibidores de proteasas, tales como, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiamina tetraacético) y/o benzamidinaHCl.

Los ingredientes adicionales, opcionales de una composición farmacéutica incluyen, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, iones metálico, vehículos oleosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina) y/o un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).

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

Una dosis administrada puede contener de 0,01 mg - 100 mg del derivado, o de 0,01-50 mg, o de 0,01-20 mg, o de 0,01 mg - 10 mg del derivado.

El derivado puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica. Puede administrarse a un paciente que lo necesita en diversos sitios, por ejemplo, en sitios tópicos tales como la piel o sitios de mucosa; en sitios en

donde no se produce absorción tales como en una arteria, en una vena, o en el corazón; y en sitios que implican la absorción, tales como en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

5 La ruta de administración puede ser, por ejemplo, lingual; sublingual; bucal; en la boca; oral; en el estómago; en el intestino; nasal; pulmonar, tal como a través de los bronquiolos, los alvéolos o sus combinaciones; parenteral, epidérmico; dérmico; transdérmico; conjuntival; uretral; vaginal; rectal; y/u ocular. En una modalidad particular, la ruta de administración es por vía oral.

10 Una composición puede administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo como una solución; una suspensión; una emulsión; una microemulsión; emulsiones múltiples; una espuma; una pomada; una pasta; una escayola; un ungüento; un comprimido; un comprimido recubierto; una goma masticable; un enjuague; una cápsula tal como cápsulas de gelatina duras o blandas; un supositorio; una cápsula rectal; gotas; un gel; un pulverizador; un polvo; un aerosol; un inhalante; gotas oculares; una ungüento oftálmico; un enjuague oftálmico; un pesario vaginal; un anillo vaginal; un ungüento vaginal; una solución de inyección; una solución de transformación in situ, tal como gelificación  
15 in situ, endurecimiento, precipitación y cristalización in situ; una solución de infusión; o como un implante. Una composición puede combinarse adicionalmente en un portador o sistema de administración de fármacos, por ejemplo para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la solubilidad. Una composición puede unirse a tal sistema a través de interacciones covalentes, hidrófobas y/o electrostáticas. El propósito de tal composición puede ser, por ejemplo, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia y/o aumentar la satisfacción del paciente.

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

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

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

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

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

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

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

50 El tratamiento con un derivado de acuerdo con la presente invención puede combinarse, además, con una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales, por ejemplo, que se seleccionan de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes o asociados con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: Insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de la DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo lipídico tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de la HMG CoA  
55 (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las  $\beta$ -células; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozilo, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida;  $\beta$ -bloqueadores tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de la ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril,  
60 65



quinapril y ramipril, bloqueadores de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamilo y  $\alpha$ -bloqueadores tales como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de PYY, agonistas del receptor de Y2, agonistas del receptor de Y4, agonistas mixtos del receptor de Y2/Y4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas del TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas del CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas del CRF BP (proteína de unión al factor de liberación de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas  $\beta$ 3, oxintomodulina y análogos, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos de liberación de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteínas desacopladoras 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor X retinoide), agonistas TR  $\beta$ ; antagonistas de histamina H3, agonistas o antagonistas del polipéptido inhibidor gástrico, gastrina y análogos de gastrina.

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

## 20 Indicaciones farmacéuticas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(x) prevención y/o tratamiento de enfermedades críticas, tales como el tratamiento de un paciente crítico, un paciente de polinefropatía por enfermedad crítica (CIPNP, por sus siglas en inglés), y/o un paciente con CIPNP potencial; prevención de enfermedades críticas o desarrollo de CIPNP; prevención, tratamiento y/o curación del síndrome de

respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) en un paciente; y/o para la prevención o reducción de la posibilidad de que un paciente sufra de bacteriemia, septicemia y/o choque séptico durante la hospitalización; y/o

5 (xi) prevención y/o tratamiento del síndrome del ovario poliquístico (PCOS).

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

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

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

15 Modalidades particulares

También se describen:

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

cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37),

25 cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, en donde

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

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

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

35 en donde x es un número entero en el intervalo de 8-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 6-13; y

el conector comprende el

Quím. 3a:  $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH}[(\text{CH}_2\text{)}_w\text{-NR}_1\text{R}_2]\text{-CO-}^*$ ,

40 que se conecta en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente \*-H o \*-CH<sub>3</sub>, y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

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

45

2. El derivado de la modalidad 1, en donde w es 0.

3. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-2, en donde el conector comprende el

50 Quím. 4a:  $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH(NR}_1\text{R}_2\text{)-CO-}^*$ .

4. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

5. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde q es 4.

55

6. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-5, en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son idénticos.

7. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-6 en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan \*-H.

60

8. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-7, en donde el conector comprende el

Quím. 3:  $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH}[(\text{CH}_2\text{)}_w\text{-NH}_2]\text{-CO-}^*$ .

9. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-8, en donde el conector comprende el

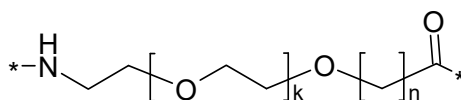
65

Quím. 4:  $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH(NH}_2\text{)-CO-}^*$ .

10. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-9, en donde el Quím. 3a es un dirradical de lisina.
11. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-10, en donde el Quím. 4a es un dirradical de lisina.
- 5 12. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-11, en donde el Quím. 3 es un dirradical de lisina.
13. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-12, en donde el Quím. 4 es un dirradical de lisina.
14. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-13, en donde el conector comprende el
- 10 Quím. 6:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-^*$ .
15. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-14, en donde  $R_1$  y  $R_2$  representan  $^*-\text{CH}_3$ .
- 15 16. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-15, en donde el Quím. 3a es un dirradical de un residuo  $\text{N}^\alpha, \text{N}^\alpha$ -dimetil lisina (6-amino-(S)-2-(dimetilamino)hexanoilo).
17. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-16, en donde el Quím. 4a es un dirradical de un residuo  $\text{N}^\alpha, \text{N}^\alpha$ -dimetil lisina.
- 20 18. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-17, en donde el conector comprende el
- Quím. 6a:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-^*$ .
- 25 19. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el conector comprende z veces el Quím. 3a, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
20. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-19, donde el conector comprende z veces el Quím. 4a, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
- 30 21. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-20, en donde el conector comprende z veces el Quím. 3, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
22. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-21, en donde el conector comprende z veces el Quím. 4, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
- 35 23. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-22, en donde el conector comprende z veces el Quím. 6a, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
- 40 24. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-23, en donde el conector comprende z veces el Quím. 6, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.
25. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-24, en donde z es 1.
- 45 26. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-25, en donde z es 2.
27. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-26, en donde cuando z es 2 los dos elementos del Quím. 3a, el Quím. 4a, el Quím. 3, el Quím. 4, el Quím. 6a o el Quím. 6 se interconectan mediante un enlace amida.
- 50 28. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-27, en donde el conector comprende el
- 2xQuím. 6:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-^*$ .
- 55 29. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-28, en donde el conector comprende el
- 2xQuím. 6a:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-^*$ .
30. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-29, en donde el Quím. 3a, el Quím. 4a, el Quím. 6, el Quím. 6a, el Quím. 3, el Quím. 4, el 2xQuím. 6, o el 2xQuím. 6a, respectivamente, es un primer elemento conector.
- 60 31. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-30, en donde el conector comprende un segundo elemento conector, el Quím. 12:

Quím. 12:

65



5

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

32. El derivado de la modalidad 31, en donde k es 1.

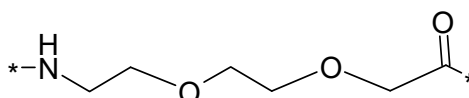
10

33. El derivado de cualquiera de las modalidades 31-32, en donde n es 1.

34. El derivado de cualquiera de las modalidades 31-33, en donde el segundo elemento conector es el

15

Quím. 13:



20

35. El derivado de cualquiera de las modalidades 31-34, en donde el Quím. 13 se incluye m veces, en donde m es 0, o un número entero en el intervalo de 1-2, o preferentemente m es 0, 1 o 2.

25

36. El derivado de cualquiera de las modalidades 35-36, en donde m es 0.

37. El derivado de cualquiera de las modalidades 35-36, en donde m es 1.

30

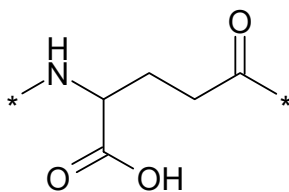
38. El derivado de cualquiera de las modalidades 35-36, en donde m es 2.

39. El derivado de cualquiera de las modalidades 35-38, en donde, cuando m es diferente de 1, los elementos del Quím. 13 se interconectan mediante enlace(s) amida.

35

40. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-39, en donde el conector comprende un tercer elemento conector del Quím. 14:

Quím. 14:



40

45

41. El derivado de la modalidad 40, en donde el Quím. 14 se incluye p veces, en donde p es 0, o un número entero en el intervalo de 1-3.

50

42. El derivado de la modalidad 41, en donde p es 0.

43. El derivado de la modalidad 41, en donde p es 1.

55

44. El derivado de la modalidad 41, en donde p es 2.

45. El derivado de la modalidad 41, en donde p es 3.

60

46. El derivado de cualquiera de las modalidades 40-45, en donde el Quím. 14 es un dirradical de L-Glu.

47. El derivado de cualquiera de las modalidades 41-46, en donde, cuando p es diferente de 0 y diferente de 1, los elementos del Quím. 14 se interconectan mediante enlace(s) amida.

65

48. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-47, en donde el conector comprende un cuarto elemento conector del Quím. 15:

## ES 2 770 599 T3

Quím. 15: \*-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CO-\*

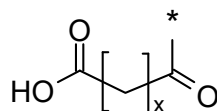
49. El derivado de la modalidad 48, en donde el Quím. 15 se incluye s veces, en donde s es 0 o 1.
- 5 50. El derivado de la modalidad 49, en donde s es 0.
51. El derivados de la modalidad 49, en donde es 1.
52. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-51, en donde el conector y la porción de prolongación se interconectan mediante un enlace amida.
- 10 53. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-52, en donde el conector y el análogo de GLP-1 se interconectan mediante un enlace amida.
- 15 54. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-53, en donde el conector se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.
55. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 20 56. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en dos veces el Quím. 14, y dos veces el Quím. 6 (2xQuím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 25 57. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en tres veces el Quím. 14 y el Quím. 6 (3xQuím.14-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 30 58. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en el Quím. 14, dos veces el Quím. 13 y el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 35 59. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en dos veces el Quím. 14, el Quím. 13, y el Quím. 6 (2xQuím.14-Quím.13-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 40 60. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en tres veces el Quím. 14, y dos veces el Quím. 6 (3xQuím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 45 61. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en el Quím. 15, el Quím. 14 y dos veces el Quím. 6 (Quím. 15-Quím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 50 62. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en el Quím. 14, dos veces el Quím. 6a (Quím.14-2xQuím. 6a), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 55 63. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde el conector consiste en
- 60 (i) el Quím. 14, dos veces el Quím. 13, y dos veces el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1;
- 65 (ii) el Quím. 14, el Quím. 13 y dos veces el Quím. 6 (Quím.14-Quím.13-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1; o

## ES 2 770 599 T3

(iii) dos veces el Quím. 14, y el Quím. 6 (2xQuím.14-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.

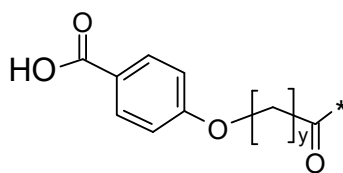
- 5 64. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63, en donde la porción de prolongación es el Quím. 1.
65. El derivado de la modalidad 64, en donde x es un número par.
66. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-65, en donde x es 12.
- 10 67. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-65, en donde x es 14.
68. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-65, en donde x es 12 o 14.
- 15 69. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-65, en donde x es 16.
70. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-69, en donde en el Quím. 1 se representa por el

Quím. 1a:



71. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63, en donde la porción de prolongación es el Quím. 2.
- 30 72. El derivado de la modalidad 71, en donde y es un número impar.
73. El derivado de la modalidad 71, en donde y es un número par.
74. El derivado de cualquiera de las modalidades 71-72, en donde y es 9.
- 35 75. El derivado de cualquiera de las modalidades 71-72, en donde y es 11.
76. El derivado de cualquiera de las modalidades 71 y 73, en donde y es 10.
- 40 77. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63 y 71-76, en donde el Quím. 2 se representa por el

Quím. 2a:



78. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-77, en donde las dos porciones de prolongación son sustancialmente idénticas.
- 55 79. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde las dos porciones de prolongación tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 60 80. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-79, en donde los dos conectores son sustancialmente idénticos.
81. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-80, en donde los dos conectores tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente, al menos 0,6; con mayor preferencia, al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia, al menos 0,9; o con la máxima preferencia, al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 65 82. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-81, en donde las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el conector son sustancialmente idénticas.

83. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-82, en donde las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el conector tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.
- 5 84. El derivado de cualquiera de las modalidades 78-83, en donde las dos estructuras químicas a comparar se representan como huellas, tales como a) huellas ECFP\_6; b) huellas UNITY; y/o c) huellas MDL; y en donde para cada uno de a), b) y c) se usa, preferentemente, el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud de las dos huellas.
- 10 85. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-84, en donde el primer residuo de K se designa K<sup>26</sup>.
86. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-85, en donde el segundo residuo de K se designa K<sup>37</sup>.
- 15 87. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-86, en donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica por escritura e inspección visual.
88. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-87, en donde la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica por escritura e inspección visual.
- 20 89. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-88, en donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifican por escritura e inspección visual.
90. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-89, en donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 25 91. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-90, en donde la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 30 92. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-91, en donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 35 93. El derivado de cualquiera de las modalidades 90-92, en donde el programa de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.
94. El derivado de cualquiera de las modalidades 90-93, en donde se usan la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 40 95. El derivado de cualquiera de las modalidades 90-94, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
96. El derivado de cualquiera de las modalidades 90-95, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 45 97. El derivado de cualquiera de las modalidades 90-96, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
98. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-97, en donde el análogo no comprende residuos de K distintos del primer y el segundo residuo de K.
- 50 99. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-98, en donde 37K se incluye entre el máximo de ocho cambios de aminoácidos.
- 55 100. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-99, que tiene un máximo de siete cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), en donde estos siete cambio(s) son además del cambio en un residuo de K en la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1).
- 60 101. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-100, en donde el(los) cambio(s) de aminoácido es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): La posición 37, y, opcionalmente, la posición 7, 8, 22, 30, 31, 34 y/o 38.
- 65 102. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-101, en donde el(los) cambio(s) de aminoácido es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): La posición 34 y 37, y, opcionalmente, la posición 7, 8, 22, 30, 31 y/o 38.

## ES 2 770 599 T3

103. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-102, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup>, y opcionalmente, al menos uno de los siguientes cambios adicionales: Imp<sup>7</sup>, Aib<sup>8</sup>, E<sup>22</sup>, E<sup>30</sup>, H<sup>31</sup>, (H<sup>34</sup> o R<sup>34</sup> o Q<sup>34</sup>), y/o E<sup>38</sup>.
- 5 104. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-103, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup>, y (H<sup>34</sup>, R<sup>34</sup>, o Q<sup>34</sup>).
105. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-103, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y H<sup>34</sup>.
106. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-103, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y R<sup>34</sup>.
- 10 107. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-103, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y Q<sup>34</sup>.
108. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-81, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Imp<sup>7</sup>, Aib<sup>8</sup>, E<sup>22</sup>, E<sup>30</sup>, H<sup>31</sup>, y/o E<sup>38</sup>.
- 15 109. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-108, en donde el análogo comprende Aib<sup>8</sup>.
110. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-109, en donde el análogo comprende E<sup>22</sup>.
- 20 111. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-110, en donde el análogo comprende H<sup>31</sup>.
112. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-111, en donde el análogo comprende Imp<sup>7</sup>.
113. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-112, en donde el análogo comprende E<sup>30</sup>.
- 25 114. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-113, en donde el análogo comprende E<sup>38</sup>.
115. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-114, en donde el análogo comprende E<sup>22</sup> y E<sup>30</sup>.
- 30 116. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-115, en donde el análogo no comprende Q<sup>34</sup>.
117. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-116, en donde el análogo no comprende H<sup>31</sup>.
118. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-117, en donde, para la determinación de los cambios en el análogo, la secuencia aminoacídica del análogo se compara con la secuencia aminoacídica de GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1).
- 35 119. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-118, en donde, para la determinación de una posición en un análogo que corresponde a una posición específica en GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1), la secuencia aminoacídica del análogo se compara con la secuencia aminoacídica de GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1).
- 40 120. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-119, en donde la comparación de la secuencia aminoacídica del análogo con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por simple escritura e inspección visual.
- 45 121. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-120, en donde la comparación de la secuencia aminoacídica del análogo con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 50 122. El derivado de la modalidad 121, en donde el programa de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.
123. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-122, en donde se usan la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 55 124. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-123, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
125. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-124, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 60 126. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-125, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
127. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-126, en donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante escritura e inspección visual.



128. El derivado de cualquiera de las modalidades 121-127, en donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica como se describe para la posición 26 y la posición 37 en cualquiera de las modalidades 87-97.
- 5 129. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-128, en donde el análogo tiene un máximo de seis cambios de aminoácidos.
130. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-129, en donde el análogo tiene un máximo de cinco cambios de aminoácidos.
- 10 131. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde el análogo tiene un máximo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 15 132. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-131, en donde el análogo tiene un máximo de tres cambios de aminoácidos.
- 20 133. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-132, en donde el análogo tiene un máximo de dos cambios de aminoácidos.
- 25 134. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-133, en donde el análogo tiene un máximo de un cambio de aminoácido.
135. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-134, en donde el análogo tiene un mínimo de una modificación de aminoácidos.
- 30 136. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-135, en donde el análogo tiene un mínimo de dos cambios de aminoácidos.
137. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-136, en donde el análogo tiene un mínimo de tres cambios de aminoácidos.
- 35 138. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-137, en donde el análogo tiene un mínimo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 40 139. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-138, en donde el análogo tiene un mínimo de cinco cambios de aminoácidos.
140. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-139, en donde el análogo tiene un mínimo de seis cambios de aminoácidos.
- 45 141. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-140, en donde el análogo tiene un cambio de aminoácido.
142. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-141, en donde el análogo tiene dos cambios de aminoácidos.
- 50 143. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-142, en donde el análogo tiene tres cambios de aminoácidos.
144. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-143, en donde el análogo tiene cuatro cambios de aminoácidos.
- 55 145. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-144, en donde el análogo tiene cinco cambios de aminoácidos.
146. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-145, en donde el análogo tiene seis cambios de aminoácidos.
147. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-146, en donde el(los) cambio(s) es/son, independientemente, sustitución(es), adición(es) y/o deleción(es).
- 60 148. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-109, en donde el(los) cambio(s) es/son sustitución(es) y/o adición(es).
149. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-148, en donde el(los) cambio(s) es/son sustitución(es).
- 65 150. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-148, en donde el(los) cambio(s) es/son adición(es).
151. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-110, en donde el análogo a) comprende un análogo de GLP-1 de la Fórmula I; y/o b) es un análogo de GLP-1 de la Fórmula I:

Fórmula I: Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Xaa<sub>18</sub>-Xaa<sub>19</sub>-Xaa<sub>20</sub>-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Xaa<sub>25</sub>-Lys-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-Xaa<sub>30</sub>-Xaa<sub>31</sub>-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-Lys-Xaa<sub>38</sub>, en donde

5 Xaa<sub>7</sub> es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N<sup>α</sup>-acetil-histidina, N<sup>α</sup>-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;

10 Xaa<sub>8</sub> es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

Xaa<sub>12</sub> es Phe o Leu;

15 Xaa<sub>16</sub> es Val o Leu;

Xaa<sub>18</sub> es Ser, Val, o Leu;

Xaa<sub>19</sub> es Tyr o Gln;

20 Xaa<sub>20</sub> es Leu o Met;

Xaa<sub>22</sub> es Gly, Glu, o Aib;

25 Xaa<sub>23</sub> es Gln, Glu o Arg;

Xaa<sub>25</sub> es Ala o Val;

Xaa<sub>27</sub> es Glu o Leu;

30 Xaa<sub>30</sub> es Ala, Glu o Arg;

Xaa<sub>31</sub> es Trp o His;

35 Xaa<sub>33</sub> es Val;

Xaa<sub>34</sub> es Glu, Asn, Gly, Gln, Arg, o His;

Xaa<sub>35</sub> es Gly o Aib;

40 Xaa<sub>36</sub> es Arg o Gly; y

Xaa<sub>38</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg, o ausente.

45 152. El derivado de la modalidad 151, en donde el péptido de la Fórmula I es un análogo de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1).

50 153. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-152, en donde Xaa<sub>7</sub> es His o Imp; Xaa<sub>8</sub> es Aib; Xaa<sub>12</sub> es Phe; Xaa<sub>16</sub> es Val; Xaa<sub>18</sub> es Ser; Xaa<sub>19</sub> es Tyr; Xaa<sub>20</sub> es Leu; Xaa<sub>22</sub> es Gly o Glu; Xaa<sub>23</sub> es Gln; Xaa<sub>25</sub> es Ala; Xaa<sub>27</sub> es Glu; Xaa<sub>30</sub> es Ala o Glu; Xaa<sub>31</sub> es Trp o His; Xaa<sub>33</sub> es Val; Xaa<sub>34</sub> es Gln, Arg, o His; Xaa<sub>35</sub> es Gly; Xaa<sub>36</sub> es Arg; y Xaa<sub>38</sub> es Glu o ausente.

154. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-153, en donde Xaa<sub>7</sub> es His.

55 155. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-153, en donde Xaa<sub>7</sub> es Imp.

156. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-155, en donde Xaa<sub>8</sub> es Aib.

157. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-156, en donde Xaa<sub>12</sub> es Phe.

60 158. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-157, en donde Xaa<sub>16</sub> es Val.

159. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-158, en donde Xaa<sub>18</sub> es Ser.

65 160. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-159, en donde Xaa<sub>19</sub> es Tyr.

161. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-160, en donde Xaa<sub>20</sub> es Leu.

162. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-161, en donde Xaa<sub>22</sub> es Gly.
163. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-161, en donde Xaa<sub>22</sub> es Glu.
- 5 164. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-163, en donde Xaa<sub>23</sub> es Gln.
165. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-164, en donde Xaa<sub>25</sub> es Ala.
166. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-165, en donde Xaa<sub>27</sub> es Glu.
- 10 167. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-166, en donde Xaa<sub>30</sub> es Ala.
168. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-166, en donde Xaa<sub>30</sub> es Glu.
- 15 169. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-168, en donde Xaa<sub>30</sub> es Glu.
170. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-169, en donde Xaa<sub>31</sub> es Trp.
171. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-170, en donde Xaa<sub>31</sub> es His.
- 20 172. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-171, en donde Xaa<sub>33</sub> es Val.
173. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-172, en donde Xaa<sub>34</sub> es Gln.
- 25 174. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-172, en donde Xaa<sub>34</sub> es Arg.
175. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-172, en donde Xaa<sub>34</sub> es His.
176. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-175, en donde Xaa<sub>35</sub> es Gly.
- 30 177. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-176, en donde Xaa<sub>36</sub> es Arg.
178. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-177, en donde Xaa<sub>38</sub> está ausente.
- 35 179. El derivado de cualquiera de las modalidades 151-177, en donde Xaa<sub>38</sub> es Glu.
180. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-179, en donde el análogo comprende los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1):
- 40 (i) 8Aib, 34R, 37K; (ii) 8Aib, 34H, 37K; (iii) 8Aib, 31H, 34Q, 37K; (iv) 8Aib, 34Q, 37K
- (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (viii) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; o (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K.
- 45 181. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-180, en donde el análogo tiene los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1):
- (i) 8Aib, 34R, 37K; (ii) 8Aib, 34H, 37K; (iii) 8Aib, 31H, 34Q, 37K; (iv) 8Aib, 34Q, 37K
- 50 (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (viii) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; o (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K
182. Un compuesto, preferentemente de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-181, que
- 55 (i) se selecciona de los siguientes:
- Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31, Quím. 32, Quím. 33, Quím. 34, Quím. 35, Quím. 36, Quím. 37, Quím. 38, Quím. 39, Quím. 40, Quím. 41, Quím. 42, Quím. 43, Quím. 44, Quím. 45, Quím. 46, Quím. 47, Quím. 48, Quím. 49, Quím. 50, Quím. 51, Quím. 52, Quím. 53,
- 60 Quím. 54, Quím. 55, Quím. 56, Quím. 57, Quím. 58, Quím. 59, Quím. 60, Quím. 61, o Quím. 62;
- (ii) caracterizado por su nombre, y que se selecciona de un listado de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-43 en la presente descripción; o
- (iii) una sal, amida, o éster aceptable farmacéuticamente del compuesto de (i) y (ii);
- 65 en donde preferentemente el compuesto de (ii) es un compuesto de (i).

183. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-182, que tiene actividad de GLP-1.
184. El derivado de la modalidad 183, en donde la actividad de GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
- 5 185. El derivado de la modalidad 184, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro, como la potencia de la producción de AMPc.
- 10 186. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-185, que tiene una potencia correspondiente a un  $EC_{50}$
- a) por debajo de 10 000 pM, preferentemente por debajo de 8000 pM, con mayor preferencia por debajo de 5000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 4000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 3000 pM;
- 15 b) por debajo de 2000 pM, preferentemente por debajo de 1200 pM, con mayor preferencia por debajo de 1000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 800 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 600 pM;
- c) por debajo de 400 pM, preferentemente por debajo de 300 pM, con mayor preferencia por debajo de 200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM; o
- 20 d) por debajo de 80 pM, preferentemente por debajo de 60 pM, con mayor preferencia por debajo de 50 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 40 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 30 pM.
187. El derivado de la modalidad 186, en donde la potencia se determina como  $EC_{50}$  para la estimulación de la formación de AMPc en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, tal como un medio de la siguiente composición (concentraciones finales en el ensayo) 50 mM TRIS-HCl; 5 mM HEPES; 10 mM  $MgCl_2$ , 6H<sub>2</sub>O; 150 mM NaCl; Tween al 0,01 %; BSA al 0,1 %; 0,5 mM IBMX; 1 mM ATP; 1 uM GTP, preferentemente mediante el uso de una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13), y/o mediante el uso de la determinación de AMPc de ensayo de receptor funcional, por ejemplo basado en la competencia entre el AMPc formado endógenamente y el AMPc marcado con biotina añadido exógenamente, en cuyo ensayo el AMPc se captura con mayor preferencia mediante el uso de un anticuerpo específico, y/o en donde un ensayo incluso más preferido es el AlphaScreen cAMP Assay, con la máxima preferencia uno de los descritos en el Ejemplo 44.
- 25 188. El derivado de cualquiera de las modalidades 183-187, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro, en un ensayo de gen reportero.
- 35 189. El derivado de la modalidad 188, en donde el ensayo se realiza en una línea celular BHK transfectada establemente que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta al AMPc (CRE) acoplado a un promotor y el gen para la luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa).
- 40 190. El derivado de la modalidad 189, en donde cuando se termina la incubación del ensayo se añade luciferina y se mide la luminiscencia.
191. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-190, en donde el ensayo se realiza en ausencia de albúmina sérica (HSA al 0 %, concentración final en el ensayo).
- 45 192. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-191, en donde el ensayo se realiza en presencia de albúmina sérica al 1 % (HSA, concentración final en el ensayo).
- 50 193. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-192, en donde las células son células BHK con BHK-ts13 como una línea celular parental.
194. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-193, en donde las células se derivan del clon FCW467-12A.
195. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-194, en donde las células se cultivan en CO<sub>2</sub> al 5 % en medio de cultivo celular, se divide en alícuotas y se almacenan en nitrógeno líquido.
- 55 196. El derivado de la modalidad 195, en donde el medio de cultivo celular es FBS al 10 % (suero fetal bovino), 1 mg/ml G418, 240 nM MTX (metotrexato) y pen/estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 %.
- 60 197. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-196, en donde antes de cada ensayo se toma una alícuota de cultivo celular y se lava dos veces en PBS antes de suspenderse a la concentración deseada en el tampón de ensayo.
- 65 198. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-197, en donde se hace la suspensión para placas de 96 pocillos para obtener una concentración final de  $5 \times 10^3$  células/pocillo.

## ES 2 770 599 T3

199. El derivado de cualquiera de las modalidades 197-198, en donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 1 %, que consiste en ovoalbúmina al 2 %, Pluronic F-68 al 0,2 % y HSA al 2 % en el medio de ensayo.
- 5 200. El derivado de cualquiera de las modalidades 197-198, en donde el tampón de ensayo es tampón de ensayo al 0 %, que consiste en ovoalbúmina al 2 % y Pluronic F-68 al 0,2 % en el medio de ensayo.
201. El derivado de cualquiera de las modalidades 199-200, en donde el medio de ensayo consiste en DMEM sin rojo de fenol, 10 mM Hepes y 1x Glutamax.
- 10 202. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-201, en donde el procedimiento del ensayo comprende las etapas siguientes:
- i) Las reservas de células se descongelan en un baño de agua a 37 °C;
- 15 ii) las células se lavan tres veces en PBS;
- iii) las células se cuentan y se ajustan a  $5 \times 10^3$  células/50  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  células/ml) en el medio de ensayo, y se transfiere una alícuota de 50  $\mu$ l de células a cada pocillo en la placa de ensayo;
- 20 iv) las soluciones concentradas de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia, en caso de haber, se diluyen a una concentración de 0,2  $\mu$ M en tampón de ensayo al 0 % para el ensayo con HSA al 0 % o tampón de ensayo al 1 % para el ensayo con HSA al 1 %; y los compuestos se diluyen 10 veces para obtener un intervalo adecuado de concentraciones (tales como:  $2 \times 10^{-7}$  M,  $2 \times 10^{-8}$  M;  $2 \times 10^{-9}$  M,  $2 \times 10^{-10}$  M,  $2 \times 10^{-11}$  M,  $2 \times 10^{-12}$  M y  $2 \times 10^{-13}$  M), y para cada compuesto se incluye, además, un control con un blanco del tampón de ensayo;
- 25 v) se transfiere una alícuota de 50  $\mu$ l de compuesto o blanco por triplicado desde la placa de dilución a la placa de ensayo, y los compuestos se prueban a concentraciones adecuadas (tales como las siguientes concentraciones finales:  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M;  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M y  $1 \times 10^{-13}$  M);
- 30 vi) la placa de ensayo se incuba durante 3 h en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C;
- vii) la placa de ensayo se retira de la incubadora y se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 min;
- ixx) se añade una alícuota de 100  $\mu$ l de luciferina (tal como reactivo steadylite plus) a cada pocillo de la placa de ensayo;
- 35 ix) cada placa de ensayo se cubre para protegerla de la luz y se agita durante 30 min a temperatura ambiente; y
- x) cada placa de ensayo se lee, por ejemplo, en un instrumento Packard TopCount NXT.
- 40 203. El derivado de la modalidad 202, en donde los datos del instrumento TopCount se transfieren al programa informático GraphPad Prism 5 para realizar los cálculos deseados.
204. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-203, en donde los valores para cada triplicado se promedian, se realiza una regresión no lineal, y se calculan los valores de EC<sub>50</sub>.
- 45 205. El derivado de cualquiera de las modalidades 202-204, en donde la regresión es (log(agonista) frente a la respuesta- pendiente variable (parámetro cuatro)).
- 50 206. El derivado de cualquiera de las modalidades 204-205, en donde la potencia se determina como se describe en cualquiera de las modalidades 188-205.
207. El derivado de cualquiera de las modalidades 206, en donde la potencia se determina como se describe en el Ejemplo 45.
- 55 208. El derivado de cualquiera de las modalidades 183-207, que tiene una potencia correspondiente a una EC<sub>50</sub> en HSA al 0 %
- a) por debajo de 400 pM, preferentemente por debajo de 300 pM, con mayor preferencia por debajo de 200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM;
- 60 b) por debajo de 80 pM, preferentemente por debajo de 60 pM, con mayor preferencia por debajo de 50 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 40 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 30 pM;
- 65 c) por debajo de 25 pM, preferentemente por debajo de 20 pM, con mayor preferencia por debajo de 15 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 10 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 8,0 pM; o

## ES 2 770 599 T3

d) por debajo de 6,0 pM, preferentemente por debajo de 5,0 pM, con mayor preferencia por debajo de 4,0 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 3,0 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 2,0 pM.

- 5 209. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-208, cuyo valor de EC<sub>50</sub> no es más de 20 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
210. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-209, cuyo valor de EC<sub>50</sub> no es más de 15 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
- 10 211. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-210, cuyo valor de EC<sub>50</sub> no es más de 10 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
212. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-211, cuyo valor de EC<sub>50</sub> no es más de 5 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
- 15 213. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-212, cuyo valor de EC<sub>50</sub> no es más de 2,5 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
- 20 214. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-213, cuyo valor de EC<sub>50</sub> es menor que el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
215. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-214, cuyo valor de EC<sub>50</sub> es menor que 0,75 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
- 25 216. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-215, cuyo valor de EC<sub>50</sub> es menor que 0,50 veces el valor de EC<sub>50</sub> para la semaglutida.
- 30 217. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-216, cuyo valor de EC<sub>50</sub> es menor que 0,60 veces el valor de EC<sub>50</sub> para un compuesto comparador que es idéntico al derivado en cuestión excepto que el conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 13, interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1; en donde los dos valores de EC<sub>50</sub> se determinan en el mismo ensayo de potencia in vitro, preferentemente como se describe en cualquiera de las modalidades 185-187.
- 35 218. El derivado de la modalidad 217, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,50 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
219. El derivado de la modalidad 217, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,40 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
- 40 220. El derivado de la modalidad 217, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,30 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
221. El derivado de la modalidad 217, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,20 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
- 45 222. El derivado de cualquiera de las modalidades 188-221, cuyo valor de EC<sub>50</sub> es menor o igual que 0,61 veces el valor de EC<sub>50</sub> para un compuesto comparador que es idéntico al derivado en cuestión excepto que el conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 13, interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1; en donde los dos valores de EC<sub>50</sub> se determinan en el mismo ensayo de potencia in vitro, preferentemente como se describe en cualquiera de las modalidades 188-205, y en ausencia de albúmina sérica humana en el ensayo (HSA al 0 %, concentración final en el ensayo).
- 50 223. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,60 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
224. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,50 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
- 60 225. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,40 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
226. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de EC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,30 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
- 65

## ES 2 770 599 T3

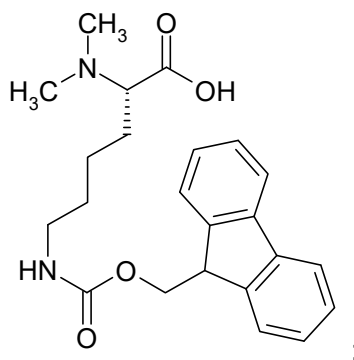
227. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de  $EC_{50}$  del derivado es menor que 0,20 veces el valor de  $EC_{50}$  para el compuesto comparador.
- 5 228. El derivado de la modalidad 222, en donde el valor de  $EC_{50}$  del derivado es menor que 0,10 veces el valor de  $EC_{50}$  para el compuesto comparador.
229. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-228, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 ( $IC_{50}$ ) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja) está
- 10 a) por debajo de 500 nM, preferentemente por debajo de 250 nM, con mayor preferencia por debajo de 100 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 50 nM;
- b) por debajo de 10 nM, preferentemente por debajo de 8,0 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 6,0 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 5,0 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 2,00 nM; o
- 15 c) por debajo de 1,00 nM, preferentemente por debajo de 0,80 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 0,60 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 0,50 nM; o
- d) por debajo de 0,40 nM, preferentemente por debajo de 0,30 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 0,20 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 0,10 nM.
230. El derivado de la modalidad 229, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide por la afinidad de unión al receptor de GLP-1 ( $IC_{50}$ ) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja).
- 25 231. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-230, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 ( $IC_{50}$ ) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta) está
- a) por debajo de 1000 nM, preferentemente por debajo de 800 nM;
- 30 b) por debajo de 700 nM, preferentemente por debajo de 500 nM, con mayor preferencia por debajo de 300 nM; o
- c) por debajo de 200 nM, preferentemente por debajo de 100 nM, con mayor preferencia por debajo de 50 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 40 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 30 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 20 nM.
- 35 232. El derivado de cualquiera de las modalidades 229-231, en donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide mediante el desplazamiento de  $^{125}I$ -GLP-1 del receptor, preferentemente mediante el uso de un ensayo de unión a SPA.
- 40 233. El derivado de la modalidad 232, en donde el receptor de GLP-1 se prepara mediante el uso de una línea celular estable, transfectada, preferentemente una línea celular de hámster, con mayor preferencia una línea celular de riñón de hámster bebé, tal como BHK tk-ts13.
234. El derivado de cualquiera de las modalidades 229-233, en donde el valor de  $IC_{50}$  se determina como la concentración que desplaza el 50 % de  $^{125}I$ -GLP-1 del receptor.
- 45 235. El derivado de cualquiera de las modalidades 229-234, en donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 ( $IC_{50}$ ) se determina como se describe en el Ejemplo 46.
- 50 236. El derivado de cualquiera de las modalidades 229-235, cuyo valor de  $IC_{50}$  es menor que 0,50 veces el valor de  $IC_{50}$  para un compuesto comparador que es idéntico al derivado en cuestión excepto que el conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 13 (gGlu-2xOEG), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1; en donde los dos valores de  $IC_{50}$  se determinan en
- 55 el mismo ensayo de unión al receptor de GLP-1, preferentemente como se describe en cualquiera de las modalidades 229-230 y 232-235, y con una concentración baja de albúmina sérica humana en el ensayo (HSA al 0,001 %, concentración final en el ensayo).
237. El derivado de la modalidad 236, en donde el valor de  $IC_{50}$  del derivado es menor que 0,40 veces el valor de  $IC_{50}$  para el compuesto comparador.
- 60 238. El derivado de la modalidad 236, en donde el valor de  $IC_{50}$  del derivado es menor que 0,30 veces el valor de  $IC_{50}$  para el compuesto comparador.
- 65 239. El derivado de la modalidad 236, en donde el valor de  $IC_{50}$  del derivado es menor que 0,20 veces el valor de  $EC_{50}$  para el compuesto comparador.

240. El derivado de la modalidad 236, en donde el valor de IC<sub>50</sub> del derivado es menor que 0,10 veces el valor de EC<sub>50</sub> para el compuesto comparador.
- 5 241. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-240, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de la semaglutida.
242. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-241, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de liraglutida.
- 10 243. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-242, en donde el derivado es eficaz a menor glucosa en sangre in vivo en ratones db/db.
244. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-243, en donde el derivado es eficaz a menor peso corporal in vivo en ratones db/db.
- 15 245. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-244 que, en un estudio PD en cerdos, reduce la ingesta de alimentos en el día 1, 2, 3 y/o 4 después de la administración s.c. de una dosis única del derivado, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo, en donde preferentemente la dosis es 0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg; con mayor preferencia 3,0 nmol/kg.
- 20 246. El derivado de la modalidad 245, en donde la ingesta de alimentos en el día 1 es 80 % o menor, preferentemente 60 % o menor, con mayor preferencia 50 % o menor, incluso con mayor preferencia 40 % o menor, aún con mayor preferencia 30 % o menor, o con la máxima preferencia 15 % o menor; en donde el porcentaje es relativo a la ingesta de alimentos del grupo de control.
- 25 247. El derivado de cualquiera de las modalidades 245-246, en donde la ingesta de alimentos en el día 2 es 80 % o menor, preferentemente 60 % o menor, con mayor preferencia 40 % o menor, o con la máxima preferencia 20 % o menor, en donde el porcentaje es relativo a la ingesta de alimentos del grupo de control.
- 30 248. El derivado de cualquiera de las modalidades 245-247, en donde la ingesta de alimentos en el día 3 es 90 % o menor, preferentemente 80 % o menor, o con la máxima preferencia 75 % o menor, en donde el porcentaje es relativo a la ingesta de alimentos del grupo de control.
- 35 249. El derivado de cualquiera de las modalidades 245-248, en donde el estudio se realiza y los datos se compilan y analizan como se describe en el Ejemplo 49.
250. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-249, que tiene un perfil de acción más prolongado que liraglutida.
- 40 251. El derivado de la modalidad 250, en donde la prolongación significa vida media in vivo en especies relevantes de animales, tales como ratones db/db, rata, cerdo y/o, preferentemente, minicerdo; en donde el derivado se administra por vía i) s.c. y/o ii) i.v.; preferentemente ii) i.v.
- 45 252. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-251, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en rata es mayor que la de la semaglutida.
253. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-252, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en rata es al menos a) 25 % mayor, b) 50 % mayor, c) 75 % mayor, d) 100 % mayor (=dos veces), o e) 150 % mayor que la vida media terminal de la semaglutida.
- 50 254. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-253, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en rata es al menos tres veces la vida media terminal de la semaglutida.
255. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-254, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en rata es al menos cuatro veces la vida media terminal de la semaglutida.
- 55 256. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-255, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en rata es al menos cinco veces la vida media terminal de la semaglutida.
- 60 257. El derivado de cualquiera de las modalidades 250-256, en donde la vida media se determina en estudios farmacocinéticos in vivo en rata, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 48.
258. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-257, en donde la vida media terminal (T<sub>½</sub>) después de la administración i.v. en minicerdos es
- 65



- a) al menos 8 horas, preferentemente al menos 16 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, incluso con mayor preferencia al menos 32 horas, o con la máxima preferencia al menos 40 horas;
- 5 b) al menos 50 horas, preferentemente al menos 60 horas, con mayor preferencia al menos 70 horas, incluso con mayor preferencia al menos 80 horas, o con la máxima preferencia, al menos 90 horas; o
- c) al menos 95 horas, preferentemente al menos 100 horas, incluso con mayor preferencia al menos 105 horas, o con la máxima preferencia al menos 115 horas.
- 10 259. El derivado de la modalidad 258, en donde los minicerdos son minicerdos machos Göttingen.
260. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-259, en donde los minicerdos tienen 7-14 meses de edad y pesan, preferentemente, de 16-35 kg.
- 15 261. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-260, en donde los minicerdos se alojan individualmente y se alimentan una o dos veces al día, preferentemente con dieta para minicerdo SDS.
262. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-261, en donde el derivado se dosifica, i.v., después de al menos 2 semanas de aclimatación.
- 20 263. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-262, en donde los animales se someten a ayuno durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y durante 0 a 4 h después de la dosificación y tienen acceso libre al agua durante todo el período.
- 25 264. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-263, en donde el derivado de GLP-1 se disuelve en 50 mM fosfato de sodio, 145 nM cloruro de sodio, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración adecuada, preferentemente de 20-60 nmol/ml.
- 30 265. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-264, en donde inyecciones intravenosas del derivado se dan en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.
266. El derivado de cualquiera de las modalidades 258-265, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) se determina en estudios farmacocinéticos in vivo en minicerdos, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 47.
- 35 267. Un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (iix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; o (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii), (v), (vii), (iix), o (ix).
- 40 268. Un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 que se selecciona de los siguientes análogos de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K; (vii) 7Imp, 8Aib, 34R, 37K; (iix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K, 38E; y (ix) 8Aib, 22E, 30E, 34R, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii), (v), (vi), (vii), (iix), o (ix).
- 45 269. El análogo de cualquiera de las modalidades 267-268, en donde la comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por simple escritura e inspección visual.
270. El análogo de cualquiera de las modalidades 267-269, en donde la comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 50 271. El análogo de la modalidad 270, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.
272. El análogo de cualquiera de las modalidades 270-271, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 55 273. El análogo de cualquiera de las modalidades 270-272, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
274. El análogo de cualquiera de las modalidades 270-273, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 60 275. El análogo de cualquiera de las modalidades 270-274, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
- 65 276. Un compuesto que se selecciona de ácido (S)-2-dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-hexanoico; y el

Quím. 63:



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

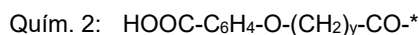
277. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-266, o un análogo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 267-275, para su uso como un medicamento.

278. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-266, o un análogo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 267-275, para su uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- $\beta$ , y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética.

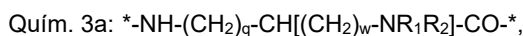
279. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-266, o un análogo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 267-275, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- $\beta$ , y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética.

280. Un método para tratar o prevenir todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células- $\beta$ , y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-266, o un análogo de acuerdo con cualquiera de las modalidades 267-275.

La invención se refiere, además, a un derivado de un análogo de GLP-1, cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), cuyo derivado comprende una primera y una segunda porción de prolongación unidas a dichos primer y segundo residuo de K, respectivamente, a través de un primer y un segundo conector, respectivamente, en donde la primera y la segunda porción de prolongación se seleccionan del Quím. 2, y el Quím. 1:



en el que x es un número entero en el intervalo de 8-16 y y es un número entero en el intervalo de 6-13; y el primer y segundo conector comprende el Quím. 3a:



que se conecta en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente \*-H (un radical de hidrógeno) o \*-CH<sub>3</sub> (metilo), y w es un número entero en el intervalo de 0-5; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este;

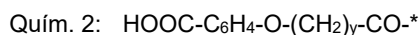
así como también, cualquiera de las modalidades anteriores 2-280, adjuntas a la presente como modalidades dependientes.

Modalidades particulares adicionales

5 1. Un derivado de un análogo de GLP-1,  
cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37),

10 cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, en donde

15 la porción de prolongación se selecciona del Quím. 2 y el Quím. 1:



20 en el que x es un número entero en el intervalo de 8-14 y "y" es un número entero en el intervalo de 6-13; y

el conector comprende el

25 Quím. 3:  $^*\text{-NH-(CH}_2\text{)}_q\text{-CH}[(\text{CH}_2\text{)}_w\text{-NH}_2]\text{-CO-}^*$ ,

que se conecta en su extremo CO-<sup>\*</sup> al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

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

2. El derivado de la modalidad 1, en donde el conector comprende z veces el Quím. 3, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

35 3. El derivado de la modalidad 2, en donde z es 1.

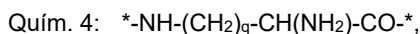
4. El derivado de la modalidad 2, en donde z es 2.

40 5. El derivado de cualquiera de las modalidades 2 y 4, en donde cuando z es 2, los elementos del Quím. 3 se interconectan a través de un enlace amida.

6. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-5, en donde w es 0.

45 7. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-6, en donde q es 4.

8. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-7, en donde el conector comprende el

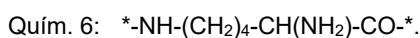


50 en donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

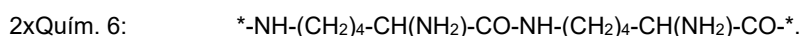
9. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-8, en donde q es 4.

55 10. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-9, en donde el Quím. 3, o el Quím. 4, respectivamente, es un dirradical de lisina.

11. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-10, en donde el conector comprende el



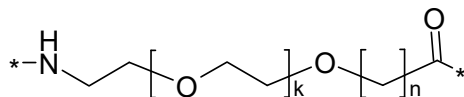
60 12. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-11, en donde el conector comprende el



65 13. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-12, en donde el Quím. 3, el Quím. 4, el Quím. 6, o el 2xQuím. 6, respectivamente, es un primer elemento conector.

14. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-13, en donde el conector comprende un segundo elemento conector, el Quím. 12:

Quím. 12:



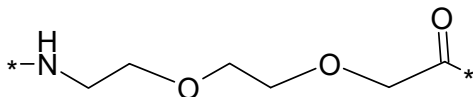
en donde k es un número entero en el intervalo de 1-5, y n es un número entero en el intervalo de 1-5.

15. El derivado de la modalidad 14, en donde k es 1.

16. El derivado de cualquiera de las modalidades 14-15, en donde n es 1.

17. El derivado de cualquiera de las modalidades 14-16, en donde el segundo elemento conector es el

Quím. 13:



18. El derivado de cualquiera de las modalidades 14-17, en donde el Quím. 13 se incluye m veces, en donde m es 0, o un número entero en el intervalo de 1-2.

19. El derivado de la modalidad 18, en donde m es 0, 1, o 2.

20. El derivado de cualquiera de las modalidades 18-19, en donde m es 0.

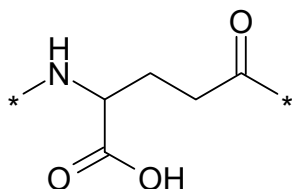
21. El derivado de cualquiera de las modalidades 18-19, en donde m es 1.

22. El derivado de cualquiera de las modalidades 18-19, en donde m es 2.

23. El derivado de cualquiera de las modalidades 18-22, en donde, cuando m es diferente de 1, los elementos del Quím. 13 se interconectan mediante enlace(s) amida.

24. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-23, en donde el conector comprende un tercer elemento conector del Quím. 14:

Quím. 14:



25. El derivado de la modalidad 24, en donde el Quím. 14 se incluye p veces, en donde p es 0, o un número entero en el intervalo de 1-3.

26. El derivado de la modalidad 25, en donde p es 0.

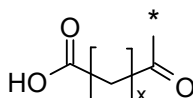
27. El derivado de la modalidad 25, en donde p es 1.

28. El derivado de la modalidad 25, en donde p es 2.

29. El derivado de la modalidad 25, en donde p es 3.

30. El derivado de cualquiera de las modalidades 24-29, en donde el Quím. 14 es un dirradical de L-Glu.
31. El derivado de cualquiera de las modalidades 25-30, en donde, cuando p es diferente de 0 y diferente de 1, los elementos del Quím. 14 se interconectan mediante enlace(s) amida.
- 5 32. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-31, en donde el conector y la porción de prolongación se interconectan mediante un enlace amida.
- 10 33. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el conector y el análogo de GLP-1 se interconectan mediante un enlace amida.
- 15 34. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-33, en donde el conector se une al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K.
- 20 35. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-34, en donde el conector consiste en el Quím. 14 y dos veces el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.6), interconectados a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectados en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 25 36. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-34, en donde el conector consiste en dos veces el Quím. 14, y dos veces el Quím. 6 (2xQuím.14-2xQuím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 30 37. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-34, en donde el conector consiste en tres veces el Quím. 14 y el Quím.6 (3xQuím.14-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación, y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 35 38. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-34, en donde el conector consiste en el Quím. 14, dos veces el Quím. 13 y el Quím. 6 (Quím.14-2xQuím.13-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 40 39. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-34, en donde el conector consiste en dos veces el Quím. 14, el Quím. 13, y el Quím. 6 (2xQuím.14-Quím.13-Quím.6), interconectado a través de enlaces amida y en la secuencia indicada, conectado en su extremo \*-NH al extremo CO-\* de la porción de prolongación y en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1.
- 45 40. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-39, en donde la porción de prolongación es el Quím. 1.
41. El derivado de la modalidad 40, en donde x es un número par.
42. El derivado de cualquiera de las modalidades 40-41, en donde x es 12.
43. El derivado de cualquiera de las modalidades 40-41, en donde x es 14.
44. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-39, en donde la porción de prolongación es el Quím. 2.
- 50 45. El derivado de la modalidad 44, en donde y es un número impar.
46. El derivado de la modalidad 44, en donde y es un número par.
47. El derivado de cualquiera de las modalidades 44-45, en donde y es 9.
- 55 48. El derivado de cualquiera de las modalidades 44-45, en donde y es 11.
49. El derivado de cualquiera de las modalidades 44 y 46, en donde y es 10.
- 60 50. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-43, en donde en el Quím. 1 se representa por el

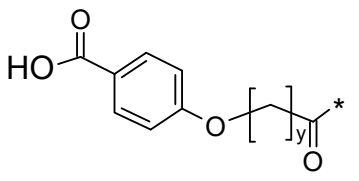
Quím. 1a:



65

51. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-39 y 44-49, en donde el Quím. 2 se representa por el

Quím. 2a:



52. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-51, en donde las dos porciones de prolongación son sustancialmente idénticas.

53. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-52, en donde las dos porciones de prolongación tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.

54. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-53, en donde los dos conectores son sustancialmente idénticos.

55. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-54, en donde los dos conectores tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente, al menos 0,6; con mayor preferencia, al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia, al menos 0,9; o con la máxima preferencia, al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.

56. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-55, en donde las dos cadenas laterales que consisten en la porción de prolongación y el conector son sustancialmente idénticas.

57. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-56, en donde las dos cadenas laterales consisten en una porción de prolongación y un conector que tienen una similitud de al menos 0,5; preferentemente al menos 0,6; con mayor preferencia al menos 0,7, o al menos 0,8; incluso con mayor preferencia al menos 0,9; o con la máxima preferencia al menos 0,99, tal como una similitud de 1,0.

58. El derivado de cualquiera de las modalidades 52-57, en donde las dos estructuras químicas a comparar se representan como huellas, tales como a) huellas ECFP<sub>6</sub>; b) huellas UNITY; y/o c) huellas MDL; y en donde para cada uno de a), b) y c) se usa, preferentemente, el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud de las dos huellas.

59. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-58, en donde el primer residuo de K se designa K<sup>26</sup>.

60. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-59, en donde el segundo residuo de K se designa K<sup>37</sup>.

61. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-60, en donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

62. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-61, en donde la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica por escritura e inspección visual.

63. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-62, en donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifican por escritura e inspección visual.

64. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-63, en donde la posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

65. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-64, en donde la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

66. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-65, en donde el número de cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.

67. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-66, en donde el programa de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.

## ES 2 770 599 T3

68. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-67, en donde se usan la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 5 69. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-68, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
70. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-69, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 10 71. El derivado de cualquiera de las modalidades 64-70, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
72. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el análogo no comprende residuos de K distintos del primer y el segundo residuo de K.
- 15 73. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-72, en donde 37K se incluye entre el máximo de ocho cambios de aminoácidos.
74. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-72, que tiene un máximo de siete cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37), en donde estos siete cambio(s) son además del cambio en un residuo de K en la posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1).
- 20 75. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-74, en donde el(los) cambio(s) de aminoácidos es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): Posición 37, y, opcionalmente, la posición 8, 22, 31, y/o 34.
- 25 76. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el(los) cambio(s) de aminoácidos es(son) en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): La posición 34 y 37, y, opcionalmente, la posición 8, 22 y/o 31.
- 30 77. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-76, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup>, y, opcionalmente, al menos uno de los siguientes cambios adicionales: Aib<sup>8</sup>, E<sup>22</sup>, H<sup>31</sup>, y/o (H<sup>34</sup> o R<sup>34</sup> o Q<sup>34</sup>).
78. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-77, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup>, y (H<sup>34</sup>, R<sup>34</sup>, o Q<sup>34</sup>).
- 35 79. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y H<sup>34</sup>.
80. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y R<sup>34</sup>.
- 40 81. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-78, en donde el análogo comprende K<sup>37</sup> y Q<sup>34</sup>.
82. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-81, en donde el análogo comprende al menos uno de los siguientes cambios: Aib<sup>8</sup>, E<sup>22</sup>, y/o H<sup>31</sup>.
- 45 83. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-82, en donde el análogo comprende Aib<sup>8</sup>.
84. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-83, en donde el análogo comprende E<sup>22</sup>.
85. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-84, en donde el análogo comprende H<sup>31</sup>.
- 50 86. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-85, en donde, para la determinación de los cambios en el análogo, la secuencia aminoacídica del análogo se compara con la secuencia aminoacídica de GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1).
87. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-86, en donde, para la determinación de una posición en un análogo que corresponde a una posición específica en GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1), la secuencia aminoacídica del análogo se compara con la secuencia aminoacídica de GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1).
- 55 88. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-87, en donde la comparación de la secuencia aminoacídica del análogo con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por simple escritura e inspección visual.
- 60 89. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-88, en donde la comparación de la secuencia aminoacídica del análogo con la de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
- 65 90. El derivado de la modalidad 89, en donde el programa de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.

91. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-90, en donde se usan la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
- 5 92. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-91, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
93. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-92, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
- 10 94. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-93, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
95. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-94, en donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica mediante escritura e inspección visual.
- 15 96. El derivado de cualquiera de las modalidades 89-95, en donde la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones indicadas de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se identifica como se describe para la posición 26 y la posición 37 en cualquiera de las modalidades 61-71.
- 20 97. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-96, en donde el análogo tiene un máximo de cuatro cambios de aminoácidos.
98. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-97, en donde el análogo tiene un máximo de tres cambios de aminoácidos.
- 25 99. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-98, en donde el análogo tiene un máximo de dos cambios de aminoácidos.
100. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-99 en donde el análogo tiene un máximo de un cambio de aminoácido.
- 30 101. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-100, en donde el análogo tiene un mínimo de una modificación de aminoácidos.
102. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-101, en donde el análogo tiene un mínimo de dos cambios de aminoácidos.
- 35 103. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-102, en donde el análogo tiene un mínimo de tres cambios de aminoácidos.
104. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-103, en donde el análogo tiene un mínimo de cuatro cambios de aminoácidos.
- 40 105. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-104, en donde el análogo tiene un cambio de aminoácido.
- 45 106. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-104, en donde el análogo tiene dos cambios de aminoácidos.
107. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-104, en donde el análogo tiene tres cambios de aminoácidos.
- 50 108. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-104, en donde el análogo tiene cuatro cambios de aminoácidos.
109. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-108, en donde los cambios son, independientemente, sustituciones, adiciones y/o deleciones.
- 55 110. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-109, en donde los cambios son sustituciones.
111. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-110, en donde el análogo a) comprende un análogo de GLP-1 de la Fórmula I; y/o b) es un análogo de GLP-1 de la Fórmula I:

60 Fórmula I: Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Xaa<sub>18</sub>-Xaa<sub>19</sub>-Xaa<sub>20</sub>-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Xaa<sub>25</sub>-Lys-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-Xaa<sub>30</sub>-Xaa<sub>31</sub>-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-Lys-Xaa<sub>38</sub>, en donde

Xaa<sub>7</sub> es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N<sup>α</sup>-acetil-histidina, N<sup>α</sup>-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;

65



Xaa<sub>8</sub> es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

5 Xaa<sub>12</sub> es Phe o Leu;

Xaa<sub>16</sub> es Val o Leu;

Xaa<sub>18</sub> es Ser, Val, o Leu;

10

Xaa<sub>19</sub> es Tyr o Gln;

Xaa<sub>20</sub> es Leu o Met;

15 Xaa<sub>22</sub> es Gly, Glu, o Aib;

Xaa<sub>23</sub> es Gln, Glu o Arg;

Xaa<sub>25</sub> es Ala o Val;

20

Xaa<sub>27</sub> es Glu o Leu;

Xaa<sub>30</sub> es Ala, Glu o Arg;

25 Xaa<sub>31</sub> es Trp o His

Xaa<sub>33</sub> es Val;

Xaa<sub>34</sub> es Glu, Asn, Gly, Gln, Arg, o His;

30

Xaa<sub>35</sub> es Gly o Aib;

Xaa<sub>36</sub> es Arg o Gly; y

35 Xaa<sub>38</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg, o ausente.

112. El derivado de la modalidad 111, en donde el péptido de la Fórmula I es un análogo de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1).

40 113. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-112, en donde Xaa<sub>7</sub> es His; Xaa<sub>8</sub> es Aib; Xaa<sub>12</sub> es Phe; Xaa<sub>16</sub> es Val; Xaa<sub>18</sub> es Ser; Xaa<sub>19</sub> es Tyr; Xaa<sub>20</sub> es Leu; Xaa<sub>22</sub> es Gly o Glu; Xaa<sub>23</sub> es Gln; Xaa<sub>25</sub> es Ala; Xaa<sub>27</sub> es Glu; Xaa<sub>30</sub> es Ala; Xaa<sub>31</sub> es Trp o His; Xaa<sub>33</sub> es Val; Xaa<sub>34</sub> es Gln, Arg, o His; Xaa<sub>35</sub> es Gly; Xaa<sub>36</sub> es Arg; y Xaa<sub>38</sub> está ausente.

45 114. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-113, en donde Xaa<sub>7</sub> es His.

115. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-114, en donde Xaa<sub>8</sub> es Aib.

116. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-115, en donde Xaa<sub>12</sub> es Phe.

50 117. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-116, en donde Xaa<sub>16</sub> es Val.

118. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-117, en donde Xaa<sub>18</sub> es Ser.

119. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-118, en donde Xaa<sub>19</sub> es Tyr.

55

120. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-119, en donde Xaa<sub>20</sub> es Leu.

121. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-120, en donde Xaa<sub>22</sub> es Gly.

60 122. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-121, en donde Xaa<sub>22</sub> es Glu.

123. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-122, en donde Xaa<sub>23</sub> es Gln.

124. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-123, en donde Xaa<sub>25</sub> es Ala.

65

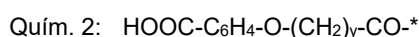
125. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-124, en donde Xaa<sub>27</sub> es Glu.

126. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-125, en donde Xaa<sub>30</sub> es Ala.
127. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-126, en donde Xaa<sub>30</sub> es Glu.
- 5 128. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-127, en donde Xaa<sub>31</sub> es Trp.
129. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-128, en donde Xaa<sub>31</sub> es His.
130. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-129, en donde Xaa<sub>33</sub> es Val.
- 10 131. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-130, en donde Xaa<sub>34</sub> es Gln.
132. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-131, en donde Xaa<sub>34</sub> es Arg.
- 15 133. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-132, en donde Xaa<sub>34</sub> es His.
134. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-133, en donde Xaa<sub>35</sub> es Gly.
135. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-134, en donde Xaa<sub>36</sub> es Arg.
- 20 136. El derivado de cualquiera de las modalidades 111-135, en donde Xaa<sub>38</sub> está ausente.
137. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-136, en donde el análogo comprende los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1):
- 25 (i) 8Aib, 34R, 37K; (ii) 8Aib, 34H, 37K; (iii) 8Aib, 31H, 34Q, 37K; (iv) 8Aib, 34Q, 37K
- (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; o (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K.
- 30 138. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-137, en donde el análogo tiene los siguientes cambios de aminoácidos, en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (i) 8Aib, 34R, 37K; (ii) 8Aib, 34H, 37K; (iii) 8Aib, 31H, 34Q, 37K; (iv) 8Aib, 34Q, 37K (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; o (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K.
139. Un compuesto, preferentemente de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-138, que se selecciona de los siguientes: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31, Quím. 32, Quím. 33, Quím. 34, Quím. 35, Quím. 36, Quím. 37, Quím. 38, Quím. 39, Quím. 40, Quím. 41, y Quím. 42; o una sal, amida, o éster aceptable farmacéuticamente de este.
- 35 140. Un compuesto caracterizado por su nombre y que se selecciona de una lista de cada uno de los nombres de los compuestos de los Ejemplos 1-22 en la presente descripción; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.
- 40 141. El compuesto de la modalidad 140, que es un compuesto de la modalidad 139.
- 45 142. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-141, que tiene actividad de GLP-1.
143. El derivado de la modalidad 142, en donde la actividad de GLP-1 se refiere a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano.
- 50 144. El derivado de la modalidad 143, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide en un ensayo in vitro, como la potencia de la producción de AMPc.
145. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-144, que tiene una potencia correspondiente a un EC<sub>50</sub>
- 55 a) por debajo de 10 000 pM, preferentemente por debajo de 8000 pM, con mayor preferencia por debajo de 5000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 4000 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 3000 pM;
- b) por debajo de 2000 pM, preferentemente por debajo de 1200 pM, con mayor preferencia por debajo de 1000 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 800 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 600 pM;
- 60 c) por debajo de 400 pM, preferentemente por debajo de 300 pM, con mayor preferencia por debajo de 200 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 150 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 100 pM; o
- 65 d) por debajo de 80 pM, preferentemente por debajo de 60 pM, con mayor preferencia por debajo de 50 pM, incluso con mayor preferencia por debajo de 40 pM, o con la máxima preferencia por debajo de 30 pM.

- 5 146. El derivado de la modalidad 145, en donde la potencia se determina como EC<sub>50</sub> para la estimulación de la formación de AMPc en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano, preferentemente mediante el uso de una línea celular transfectada estable tal como BHK467-12A (tk-ts13), y/o mediante el uso de la determinación de AMPc de ensayo de receptor funcional, por ejemplo basado en la competencia entre el AMPc formado endógenamente y el AMPc marcado con biotina añadido exógenamente, en cuyo ensayo el AMPc se captura con mayor preferencia mediante el uso de un anticuerpo específico, y/o en donde un ensayo incluso más preferido es el AlphaScreen cAMP Assay, con la máxima preferencia uno de los que se describe en el Ejemplo 44.
- 10 147. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-146, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC<sub>50</sub>) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja) está
- a) por debajo de 500 nM, preferentemente por debajo de 250 nM, con mayor preferencia por debajo de 100 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 50 nM;
- 15 b) por debajo de 10 nM, preferentemente por debajo de 8,0 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 6,0 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 5,0 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 2,00 nM; o
- c) por debajo de 1,00 nM, preferentemente por debajo de 0,80 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 0,60 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 0,50 nM; o
- 20 d) por debajo de 0,40 nM, preferentemente por debajo de 0,30 nM, incluso con mayor preferencia por debajo de 0,20 nM, o con la máxima preferencia por debajo de 0,10 nM.
- 25 148. El derivado de la modalidad 143, en donde la activación del receptor de GLP-1 humano se mide como la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC<sub>50</sub>) en presencia de HSA al 0,001 % (albúmina baja).
149. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-148, para el cual la afinidad de unión al receptor de GLP-1 (IC<sub>50</sub>) en presencia de HSA al 2,0 % (albúmina alta) está
- 30 a) por debajo de 1000 nM, preferentemente por debajo de 800 nM;
- b) por debajo de 700 nM, preferentemente por debajo de 500 nM, con mayor preferencia por debajo de 300 nM; o
- c) por debajo de 200 nM, preferentemente por debajo de 100 nM, o con mayor preferencia por debajo de 50 nM.
- 35 150. El derivado de cualquiera de las modalidades 147-149, en donde la afinidad de unión al receptor de GLP-1 se mide mediante el desplazamiento de <sup>125</sup>I-GLP-1 del receptor, preferentemente mediante el uso de un ensayo de unión a SPA.
- 40 151. El derivado de la modalidad 150, en donde el receptor de GLP-1 se prepara mediante el uso de una línea celular estable, transfectada, preferentemente una línea celular de hámster, con mayor preferencia una línea celular de riñón de hámster bebé, tal como BHK tk-ts13.
- 45 152. El derivado de cualquiera de las modalidades 147-151, en donde el valor de IC<sub>50</sub> se determina como la concentración que desplaza el 50 % de <sup>125</sup>I-GLP-1 del receptor.
153. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-152, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de la semaglutida.
- 50 154. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-153, que tiene una biodisponibilidad oral, preferentemente una biodisponibilidad oral absoluta, que es mayor que la de la liraglutida.
155. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-154, en donde el derivado es eficaz a menor glucosa en sangre in vivo en ratones db/db.
- 55 156. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-154, en donde el derivado es eficaz a menor peso corporal in vivo en ratones db/db.
- 60 157. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-156 que, en un estudio PD en cerdos, reduce la ingesta de alimentos en el día 1, 2, 3 y/o 4 después de la administración s.c. de una dosis única del derivado, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo, en donde preferentemente la dosis es 0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg; con mayor preferencia 3,0 nmol/kg.
- 65 158. El derivado de la modalidad 157, en donde la ingesta de alimentos en el día 1 se reduce a 80 % o menor, preferentemente a 60 % o menor, con mayor preferencia a 50 % o menor, o con la máxima preferencia a 15 % o menor.

159. El derivado de cualquiera de las modalidades 157-158, en donde la ingesta de alimentos en el día 2 se reduce a 80 % o menor, preferentemente a 60 % o menor, con mayor preferencia a 40 % o menor, o con la máxima preferencia a 20 % o menor.
- 5 160. El derivado de cualquiera de las modalidades 157-159, en donde la ingesta de alimentos en el día 3 se reduce a 90 % o menor, preferentemente a 80 % o menor, o con la máxima preferencia a 75 % o menor.
161. El derivado de cualquiera de las modalidades 157-160, en donde el estudio se realiza y los datos se compilan y analizan como se describe en el Ejemplo 49.
- 10 162. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-161, que tiene un perfil de acción más prolongado que la liraglutida.
163. El derivado de la modalidad 162, en donde la prolongación significa vida media in vivo en especies relevantes de animales, tales como ratones db/db, rata, cerdo y/o, preferentemente, minicerdo; en donde el derivado se administra i) s.c. y/o ii) i.v.; preferentemente ii) i.v.
- 15 164. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-163, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en rata es mayor que la de la semaglutida.
- 20 165. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-164, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en rata es al menos a) 25 % mayor, b) 50 % mayor, c) 75 % mayor, o d) 100 % mayor (=dos veces) que la vida media terminal de la semaglutida.
- 25 166. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-165, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en rata es al menos tres veces la vida media terminal de la semaglutida.
167. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-166, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en rata es al menos cuatro veces la vida media terminal de la semaglutida.
- 30 168. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-167, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en rata es al menos cinco veces la vida media terminal de la semaglutida.
169. El derivado de cualquiera de las modalidades 163-168, en donde la vida media se determina en estudios farmacocinéticos in vivo en rata, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 48.
- 35 170. El derivado de cualquiera de las modalidades 1-169, en donde la vida media terminal ( $T_{1/2}$ ) después de la administración i.v. en minicerdos es
- 40 a) al menos 8 horas, preferentemente al menos 16 horas, con mayor preferencia al menos 24 horas, incluso con mayor preferencia al menos 32 horas, o con la máxima preferencia al menos 40 horas;
- b) al menos 50 horas, preferentemente al menos 60 horas, con mayor preferencia al menos 70 horas, incluso con mayor preferencia al menos 80 horas, o con la máxima preferencia, al menos 90 horas; o
- 45 c) al menos 95 horas, preferentemente al menos 100 horas.
171. El derivado de la modalidad 170, en donde los minicerdos son minicerdos machos Göttingen.
- 50 172. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-171, en donde los minicerdos tienen 7-14 meses de edad y pesan, preferentemente, de 16-35 kg.
173. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-172 en donde los minicerdos se alojan individualmente y se alimentan una o dos veces al día, preferentemente con dieta para minicerdo SDS.
- 55 174. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-173, en donde el derivado se dosifica, i.v., después de al menos 2 semanas de aclimatación.
175. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-174 en donde los animales se someten a ayuno durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y durante de 0 a 4 h después de la dosificación y tienen acceso libre al agua durante todo el período.
- 60 176. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-175, en donde el derivado de GLP-1 se disuelve en 50 mM de fosfato de sodio, 145 nM de cloruro de sodio, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración adecuada, preferentemente de 20-60 nmol/ml.
- 65

177. El derivado de cualquiera de las modalidades 170-176, en donde las inyecciones intravenosas del derivado se dan en un volumen correspondiente a 1-2 nmol/kg.
- 5 178. Un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 que comprende los siguientes cambios en comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; o (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii) o (v).
- 10 179. Un producto intermedio en forma de un análogo de GLP-1 que se selecciona de los siguientes análogos de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1): (ii) 8Aib, 34H, 37K; (v) 8Aib, 22E, 34Q, 37K; y (vi) 8Aib, 22E, 34R, 37K; o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de cualquiera de los análogos de (ii), (v), o (vi).
180. El análogo de cualquiera de las modalidades 178-179, en donde la comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace por escritura e inspección visual.
- 15 181. El análogo de cualquiera de las modalidades 178-180, en donde la comparación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1) se hace mediante el uso de un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos.
182. El análogo de la modalidad 181, en donde el programa estándar de alineamiento es un alineamiento de Needleman-Wunsch.
- 20 183. El análogo de cualquiera de las modalidades 181-182, en donde se usa la matriz de puntuación predeterminada y la matriz de identidad predeterminada.
184. El análogo de cualquiera de las modalidades 181-183, en donde la matriz de puntuación es BLOSUM62.
- 25 185. El análogo de cualquiera de las modalidades 181-184, en donde la penalización por el primer residuo en una interrupción es -10 (menos diez).
186. El análogo de cualquiera de las modalidades 181-185, en donde las penalizaciones por residuos adicionales en una interrupción es -0,5 (menos coma cinco).
- 30 187. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-186, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 35 188. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-186, para el uso como un medicamento.
189. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-186, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.
- 40 190. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-186 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.
- 45 191. Un método para tratar o evitar todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética - mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-186.
- 50 La invención también se refiere a
- 55 a).Un derivado de un análogo de GLP-1,
- 60 cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37);
- cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas al primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, en donde la porción de prolongación se selecciona del Quím. 2, y el Quím. 1:
- 65



## ES 2 770 599 T3

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

en donde x es un número entero en el intervalo de 8-14, y es un número entero en el intervalo de 6-13; y

5 el conector comprende el Quím. 3:

Quím. 3:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}[(\text{CH}_2)_w-\text{NH}_2]-\text{CO}^*$ ,

10 que se conecta en su extremo  $\text{CO}^*$  al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

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

15 b). El derivado de la modalidad 1, en donde el conector comprende z veces el Quím. 3, en donde z es un número entero en el intervalo de 1-2.

c). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-2, en donde w es 0.

20 d). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde q es 4.

e). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-4, en donde el conector comprende el

Quím. 4:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}^*$ ,

25 en donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

f). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-6, en donde el conector comprende el

Quím. 6:  $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}^*$ .

30 g). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-6, en donde x es 12 o 14.

h). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-6, en donde y es 9, 10 u 11.

35 i). El derivado de cualquiera de las modalidades 1-8, en donde el análogo comprende un análogo de GLP-1 de la Fórmula I:

Fórmula I:  $\text{Xaa}_7-\text{Xaa}_8-\text{Glu}-\text{Gly}-\text{Thr}-\text{Xaa}_{12}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Asp}-\text{Xaa}_{16}-\text{Ser}-\text{Xaa}_{18}-\text{Xaa}_{19}-\text{Xaa}_{20}-\text{Glu}-\text{Xaa}_{22}-\text{Xaa}_{23}-\text{Ala}-\text{Xaa}_{25}-\text{Lys}-\text{Xaa}_{27}-\text{Phe}-\text{Ile}-\text{Xaa}_{30}-\text{Xaa}_{31}-\text{Leu}-\text{Xaa}_{33}-\text{Xaa}_{34}-\text{Xaa}_{35}-\text{Xaa}_{36}-\text{Lys}-\text{Xaa}_{38}$ , en donde

40  $\text{Xaa}_7$  es L-histidina, imidazopropionilo,  $\alpha$ -hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina,  $\beta$ -hidroxi-histidina, homohistidina,  $\text{N}^\alpha$ -acetil-histidina,  $\text{N}^\alpha$ -formil-histidina,  $\alpha$ -fluorometil-histidina,  $\alpha$ -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;

45  $\text{Xaa}_8$  es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

$\text{Xaa}_{12}$  es Phe o Leu;

50  $\text{Xaa}_{16}$  es Val o Leu;

$\text{Xaa}_{18}$  es Ser, Val, o Leu;

55  $\text{Xaa}_{19}$  es Tyr o Gln;

$\text{Xaa}_{20}$  es Leu o Met;

$\text{Xaa}_{22}$  es Gly, Glu, o Aib;

60  $\text{Xaa}_{23}$  es Gln, Glu o Arg;

$\text{Xaa}_{25}$  es Ala o Val;

65  $\text{Xaa}_{27}$  es Glu o Leu;

Xaa<sub>30</sub> es Ala, Glu o Arg;

Xaa<sub>31</sub> es Trp o His

5 Xaa<sub>33</sub> es Val;

Xaa<sub>34</sub> es Glu, Asn, Gly, Gln, Arg, o His;

10 Xaa<sub>35</sub> es Gly o Aib;

Xaa<sub>36</sub> es Arg o Gly; y

Xaa<sub>38</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg, o ausente.

15 j). Un compuesto que se selecciona de los siguientes: Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23, Quím. 24, Quím. 25, Quím. 26, Quím. 27, Quím. 28, Quím. 29, Quím. 30, Quím. 31, Quím. 32, Quím. 33, Quím. 34, Quím. 35, Quím. 36, Quím. 37, Quím. 38, Quím. 39, Quím. 40, Quím. 41, y Quím. 42; o una sal, amida, o éster aceptable farmacéuticamente de este.

20 k). Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

l). Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10, para el uso como un medicamento.

25 m). Un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.

30 n). El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.

35 o). Un método para tratar o evitar todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, complicaciones diabéticas, enfermedades críticas, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para mejorar parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética - mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10.

## EJEMPLOS

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

50 Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

### Lista de abreviaturas

55	Aib: ácido	α-aminoisobutírico
	AcOH:	ácido acético
	API:	Ingrediente farmacéutico activo
60	AUC:	Área bajo la curva
	BG:	Glucosa en sangre
	BHK	Riñón de hámster recién nacido
65	BW:	Peso Corporal

	Boc:	t-butiloxicarbonilo
	Bom:	benciloximetilo
5	BSA:	Albúmina sérica bovina
	Bzl:	bencilo
	CAS:	Servicio de Resúmenes Químicos
10	Cl:	2-clorotritilo
	colidina:	2,4,6-trimetilpiridina
15	DCM:	diclorometano
	Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
	DesH:	des-amino histidina (puede referirse, además, a ácido imidazopropiónico, Imp)
20	DIC:	diisopropilcarbodiimida
	DIPEA:	diisopropiletilamina
25	DMEM:	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)
	EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
	EGTA:	ácido etilenglicoltetraacético
30	FCS:	Suero de Ternera Fetal
	Fmoc:	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
35	HATU:	(O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
	HBTU:	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio hexafluorofosfato)
	HEPES:	ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico
40	HFIP:	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol o hexafluoroisopropanol
	HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
45	HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
	HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	HSA:	Albúmina sérica humana
50	IBMX:	3-isobutil-1-metilxantina
	Imp:	Ácido imidazopropiónico (también denominado como des-amino histidina, DesH)
55	i.v.	vía intravenosa
	iVDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
	IVGTT:	Prueba de Tolerancia a Glucosa Intravenosa
60	LCMS:	Cromatografía líquida Espectroscopía de masas
	LYD:	Landrace Yorkshire Duroc
65	MALDI-MS:	Ver MALDI-TOF MS



## ES 2 770 599 T3

	MALDI-TOF MS:	Espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de Desorción/Ionización láser asistida por matriz
	MeOH:	metanol
5	Mmt:	4-metoxitritilo
	Mtt:	4-metiltrilito
10	NMP:	N-metil pirrolidona
	OBz:	éster de benzoilo
	OEG:	ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico
15	OPfp:	pentafluorofenoxi
	OPnp:	para-nitrofenoxi
20	OSu:	Ésteres de O-succinimidilo (ésteres de hidroxisuccinimida)
	OtBu:	éster de terc-butilo
	Oxyma Pure®:	Éster etílico de ácido ciano-hidroxiimino-acético
25	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
30	PD:	Farmacodinámica
	Pen/Estrep:	Penicilina/Estreptomina
	PK:	Farmacocinética
35	RP:	Fase inversa
	RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
40	RT:	Temperatura ambiente
	Rt:	Tiempo de retención
	s.c.:	Vía subcutánea
45	SD:	Desviación estándar
	SEC-HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión de Tamaño
50	SEM:	Error estándar de la media
	SPA:	Ensayo de Proximidad por Centelleo
	SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
55	tBu:	terc-butilo
	TFA:	ácido trifluoroacético
60	TIS:	triisopropilsilano
	TLC:	Cromatografía de Capa Delgada
	Tos:	tosilato (o para-toluenosulfonilo)
65	Tris:	tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Trt: trifenilmetilo (tritulo)

Trx: ácido tranexámico

5 UPLC: Cromatografía líquida de ultraeficacia

Materiales y Métodos

Materiales

- 10 complejo de  $\alpha$ -picolina borano (CAS 3999-38-0)  
 Éster etílico del ácido ciano-hidroxiimino-acético (CAS 3849-21-6)
- 15 Ácido N- $\alpha$ ,N- $\beta$ -Di-Fmoc-L-2,3-Diaminopropiónico (CAS 201473-90-7)  
 Ácido 3,5-Di-*tert*-butil-4-hidroxibenzóico (CAS 1421-49-4)  
 Ácido 3,5-Di-*tert*-butilbenzóico (CAS 16225-26-6)
- 20 Ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (CAS 166108-71-0)  
 Ácido 17-(9-Fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-9-aza-3,6,12,15-tetraoxa-10-on-heptadecanóico (IRIS Biotech GmbH)
- 25 Ácido Fmoc-L-Glutámico 1-*tert*-butil éster (CAS 84793-07-7)  
 Ácido 2-(2-Metoxietoxi)acético (CAS 16024-56-9)  
 N- $\alpha$ ,N- $\epsilon$ -Bis(9-fluorenilmetiloxicarbonil)-L-lisina (CAS 78081-87-5)
- 30 Ácido 1-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]piperidina-4-carboxílico (CAS 148928-15-8)  
 Ácido FMOC-8-Aminocapriló (CAS 126631-93-4)
- 35 Ácido 4-fenilbutírico (CAS 1716-12-7)  
 Ácido 4-(4-Nitrofenil)butírico (CAS 5600-62-4)  
 Ácido 4-(4-clorofenil)butírico (CAS 4619-18-5)
- 40 Ácido FMOC-6-Aminohexanóico (CAS 88574-06-5)  
 Ácido FMOC-12-Aminododecanóico (CAS 128917-74-8)
- 45 Ácido 4-(9-carboxi-noniloxi)-benzoico *tert*-butil éster (preparado como se describió en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204)  
 Ácido 4-(8-Carboxi-octiloxi)-benzoico *tert*-butil éster (M.p.: 71-72 °C).
- 50  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\square_{\text{H}}$ ): 7,93 (d, J=8,9 Hz, 2 H); 6,88 (d, J=8,9 Hz, 2 H); 4,00 (t, J=6,4 Hz, 2 H); 2,36 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 1,80 (m, 2 H); 1,65 (m, 2 H); 1,59 (s, 9 H); 1,53-1,30 (m, 8 H) (preparado como se describe en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204, que reemplaza al metil 10-bromodecanoato con etil 9-Bromononanoato (CAS 28598-81-4))
- 55 Ácido 4-(7-Carboxi-heptiloxi)-benzoico *tert*-butil éster ( $^1\text{H}$  NMR espectro (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\square_{\text{H}}$ ): 7,93 (d, J=9,0 Hz, 2 H); 6,88 (d, J=9,0 Hz, 2 H); 4,00 (t, J=6,5 Hz, 2 H); 2,37 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 1,80 (m, 2 H); 1,64 (m, 2 H); 1,59 (s, 9 H); 1,53-1,33 (m, 6 H) (preparado como se describe en el Ejemplo 25, etapa 1 y 2 del documento WO 2006/082204, que reemplaza al metil 10-bromodecanoato con etil 7-bromoheptanoato (CAS 29823-18-5))

Métodos Químicos

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

65 A. Métodos Generales

## A1. Métodos de preparación

Esta sección se refiere a métodos para la síntesis de péptidos en fase sólida (métodos SPPS, que incluyen métodos para la desprotección de aminoácidos, métodos para escindir el péptido de la resina y para su purificación), así como también métodos para detectar y caracterizar el péptido resultante (métodos de LCMS, MALDI y UPLC). La síntesis de los péptidos en fase sólida puede mejorarse en algunos casos mediante el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que puede escindirse en condiciones ácidas tales como, pero sin limitarse a, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que se presenta una serina o una treonina en el péptido, pueden usarse dipéptidos de pseudoprolina (disponibles de, por ejemplo, Novobiochem, ver además W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403). Los derivados de aminoácidos protegidos 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, o, Fmoc-Val-OH etc. disponibles de, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o Novabiochem. Donde no se especifica nada más, se usa la forma L natural de los aminoácidos. El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ejemplo, Boc-His(Boc)-OH, o Boc-His(Trt)-OH para los péptidos con His en el N-terminal). En el caso de la porción de unión a albúmina modular mediante el uso de SPPS, se usaron los siguientes bloques de construcción adecuadamente protegidos tales como, pero sin limitarse a ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, ácido Fmoc-tranexámico, Fmoc-Glu-OtBu, ácido octadecanodioico mono- se usaron éster terc-butílico, éster mono-terc-butílico del ácido nonadecanodioico, éster mono-terc-butílico del ácido tetradecanodioico o éster terc-butílico del ácido 4-(9-carboxiniloxi) benzoico. Todas las operaciones indicadas a continuación se realizaron a una escala de síntesis de 250 µmol.

### 1. Síntesis de la cadena principal peptídica protegida unida a la resina

#### Método:SPPS\_P

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

#### Método:SPPS\_L

La SPPS\_L se realizó en un sintetizador de péptidos Liberty basado en microondas de CEM Corp. (Matthews, NC 28106, EE.UU.) a una escala de 250 µmol o 100 µmol mediante el uso de un exceso de seis veces de Fmoc-aminoácidos (300 mM en NMP con 300 mM HOAt u Oxyma Pure®) con relación a la carga de la resina, por ejemplo carga baja de Fmoc-Gly-Wang (0,35 mmol/g). La desprotección de Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina al 5 % en NMP a hasta 75 °C durante 30 segundos donde después se drenó la resina y se lavó con NMP y se repitió la desprotección de Fmoc esta vez durante 2 minutos a 75 °C. El acoplamiento se realizó mediante el uso de aminoácido/(HOAt u Oxyma Pure®)/DIC (1:1:1) en NMP. Los tiempos y las temperaturas de acoplamiento fueron generalmente de 5 minutos a hasta 75 °C. Los tiempos de acoplamiento más largos se usaron para reacciones a mayor escala, por ejemplo, 10 min. Los aminoácidos histidina se acoplaron doblemente a 50 °C, o se acoplaron cuatro veces si el aminoácido anterior estaba impedido estéricamente (por ejemplo, Aib). Los aminoácidos arginina se acoplaron a RT durante 25 minutos y después se calentaron hasta 75 °C durante 5 min. Algunos aminoácidos, tales como, pero sin limitarse a Aib, se "acoplaron doblemente", lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 5 min a 75 °C), la resina se drena y se añaden más reactivos (aminoácidos, (HOAt u Oxyma Pure®) y DIC), y la mezcla se calienta de nuevo (por ejemplo, 5 min a 75 °C). Se realizaron lavados con NMP (5 x 10 ml) entre las etapas de desprotección y acoplamiento.

#### Método:SPPS\_A

La resina peptidil protegida se sintetizó de acuerdo con la estrategia Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 en una escala de 250 µmol o 1000 µmol con un exceso de tres a cuatro veces de Fmoc-aminoácidos, mediante el uso de los protocolos FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) media los acoplamientos en NMP y monitorización UV de la desprotección del grupo de protección Fmoc, en algunos casos se usaron acoplamientos dobles, lo que significa que después del primer acoplamiento, la resina se drena y se añaden más Fmoc-aminoácidos y reactivos. La resina de partida usada para la síntesis de los péptidos amidas fue resina Rink-Amida y resina Wang precargada (por ejemplo, Fmoc-Gly-Wang o Fmoc-Lys(Mtt)-

wang de baja carga) o clorotritilo para los péptidos con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos- Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem) suministrados en cartuchos pesados previamente adecuados para el sintetizador ABI433A con la excepción de aminoácidos no naturales tales como Fmoc-Aib-OH (ácido Fmoc-aminoisobutírico). El aminoácido N terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ejemplo, se usó Boc-His(Boc)-OH, o Boc-His(Trt)-OH para los péptidos con His en el N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en la secuencia se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta para la unión de la porción de unión a albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede mejorarse en algunos casos mediante el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido amídico con un grupo que puede escindirse en condiciones ácidas, tales como, pero sin limitarse a, 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, pueden usarse dipéptidos de pseudoprolina (ver, por ejemplo, el catálogo de Novabiochem 2009/2010 o una versión más reciente, o WR Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403).

#### Método: SPPS\_M

SPPS\_M se refiere a la síntesis de la resina peptidilo protegida mediante el uso de química manual de Fmoc. La química de acoplamiento fue DIC/(HOAt u Oxyma Pure®)/colidina en NMP a un exceso molar de 4-10 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron 1-6 h a temperatura ambiente. La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20-25 % en NMP (3 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml).

### 2. Síntesis de cadenas laterales

#### *Monoésteres de diácidos grasos*

El reflujo durante toda la noche de los diácidos C8, C10, C12, C14, C16 y C18 con anhídrido de Boc DMAP *t*-butanol en tolueno proporciona predominantemente el monoéster de *t*-butilo. Se obtiene después del tratamiento una mezcla de monoácido, diácido y diéster. La purificación se lleva a cabo mediante lavado, filtración de sílice de tapón corto y cristalización.

### 3. Unión de las cadenas laterales a la cadena principal peptídica protegida unida a la resina

Cuando se presenta una acilación en una cadena lateral de lisina, el grupo épsilon amino de la lisina a acilar se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, en dependencia de la ruta para la unión de la porción de prolongación y el conector. La desprotección de Dde o ivDde se realizó con hidracina al 2 % en NMP (2 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con NMP (4 x 20 ml). La desprotección de Mtt o Mmt se realizó con TFA al 2 % y TIS al 2-3 % en DCM (5 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados con DCM (2 x 20 ml), MeOH al 10 % y DIPEA al 5 % en DCM (2 x 20 ml) y NMP (4 x 20 ml), o mediante el tratamiento con hexafluoroisopropanol/DCM (75:25, 5 x 20 ml, 10 min cada uno) seguido por lavados como anteriormente. En algunos casos el grupo Mtt se eliminó mediante etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos Liberty. La desprotección de Mtt se realizó con hexafluoroisopropanol o hexafluoroisopropanol/DCM (75:25) a temperatura ambiente durante 30 min seguido por el lavado con DCM (7 ml x 5), seguido por lavados con NMP (7 ml x 5). La porción de prolongación y/o el conector pueden unirse al péptido ya sea mediante la acilación del péptido unido a la resina o mediante la acilación en solución del péptido no protegido. En el caso de la unión de la porción de prolongación y/o conector a la resina peptidil protegida la unión puede ser modular mediante el uso de SPPS y bloques de construcción adecuadamente protegidos.

#### Método: SC\_P

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

#### Método: SC\_L

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

#### Método: SC\_A

El grupo de prolongación N- $\epsilon$ -lisina se eliminó como se describió anteriormente y la modificación química de la lisina se realizó mediante una o más etapas automatizadas en el sintetizador de péptidos ABI mediante el uso de bloques de construcción protegidos adecuadamente como se describió en SPPS\_A.

#### Método: SC\_M1

El grupo de prolongación N-ε-lisina se eliminó como se describió anteriormente. Se disolvió una porción de prolongación o conector activado (anhídrido activo o anhídrido simétrico) tal como éster mono-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) de ácido octadecanodioico (Ebashi y otros, documento EP511600, 4 equivalentes molares en relación al péptido unido a resina) en NMP (25 ml), se añadió a la resina y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó exhaustivamente con NMP, DCM, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

*Método:* SC\_M2

El grupo de prolongación N-ε-lisina se eliminó como se describió anteriormente. La porción de prolongación se disolvió en NMP/DCM (1:1, 10 ml). Se añadió el reactivo de activación tal como HOBt u Oxyma Pure® (4 equivalentes molares en relación a la resina) y DIC (4 equivalentes molares en relación a la resina) y la solución se agitó durante 15 minutos. La solución se añadió a la resina y se añadió DIPEA (4 equivalentes molares en relación a la resina). La resina se agitó de 2 a 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con NMP (2 x 20 ml), NMP/DCM (1:1, 2 x 20ml) y DCM (2 x 20 ml).

*Método:* SC\_M3

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

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

*Método:* CP\_M1

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

*Método:* CP\_L1

Después de la síntesis la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina mediante el uso de un Sistema de Escisión en Microondas CEM Accent. (CEM Corp., Carolina del Norte). La escisión de la resina se realizó a 38 °C durante 30 minutos mediante el tratamiento con TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5) seguido por precipitación con dietiléter. El péptido se disolvió en un disolvente adecuado (tal como, por ejemplo, ácido acético al 30 %) y se purificó mediante RP-HPLC estándar en una columna C18, de 5 μm, mediante el uso de acetonitrilo/agua/TFA. Las fracciones se analizaron mediante una combinación de métodos de UPLC, MALDI y LCMS y las fracciones apropiadas se agruparon y se liofilizaron.

#### A2. Métodos generales para la detección y caracterización

##### 1. Métodos de LC-MS

*Método:* LCMS01v1

La LCMS01v1 se realizó en una configuración que consistía en el sistema Waters Acquity UPLC y el 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\_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\_AP

La LCMS\_AP se realizó mediante el uso de 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 Waters 2420 ELS. Eluyentes: A: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua; B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo. Columna: Phenomenex Synergi MAXRP, 4 µm, 75x4,6 mm. Gradiente: 5 % - 95 % B durante 7 min a 1,0 ml/min.

## 2. Métodos de UPLC

*Método:* UPLC02v1

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, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema UPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 99,95 % H<sub>2</sub>O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH<sub>3</sub>CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 95 % A, 5 % B durante 16 minutos a una velocidad de flujo de 0,40 ml/min.

*Método:* UPLC07v1

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 215 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna kinetex 1,7u C18, 100A 2,1 x 150 mm, 60 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 90 % de agua y 10 % de CH<sub>3</sub>CN con 0,045 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,6, B: 20 % isopropanol, 20 % agua y 60 % CH<sub>3</sub>CN. Se usó el siguiente gradiente por etapa: 35 % B y 65 % A durante 2 minutos, luego 35 % B, 65 % A a 65 % B, 35 % A durante 15 minutos, luego 65 % B, 35 % A a 80 % B, 20 % A durante 3 minutos a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

*Método:* UPLC06v1

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 215 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna kinetex 1,7u C18, 100A 2,1 x 150 mm, 60 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 90 % de agua y 10 % de MecN con 0,045 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,6, B: 20 % isopropanol, 20 % agua y 60 % CH<sub>3</sub>CN. Se usó el siguiente gradiente por etapa: 25 % B y 75 % A durante 2 minutos, luego 25 % B, 75 % A a 55 % B, 45 % A durante 15 minutos, luego 55 % B, 45 % A a 80 % B, 20 % A durante 3 minutos a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

*Método:* AP\_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 recolectaron mediante el uso de una columna ACQUITY UPLC BEH130, C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm, 30 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían: A: 99,95 % H<sub>2</sub>O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH<sub>3</sub>CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,30 ml/min.

*Método:* 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 recolectaron 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: A: 99,95 % H<sub>2</sub>O, 0,05 % TFA; B: 99,95 % CH<sub>3</sub>CN, 0,05 % TFA. Se usó el siguiente gradiente lineal: 95 % A, 5 % B a 5 % A, 95 % B durante 16 minutos a una tasa de flujo de 0,40 ml/min.

*Método:* B31\_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 215 nm y 254 nm se recogieron mediante el uso de una columna kinetex 1,7u C18, 100A 2,1 x 150 mm, 60 °C. El sistema UPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían: A: 90 % de agua y 10 % de MecN con 0,045 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,6; B: 20 % isopropanol, 20 % agua y 60 % CH<sub>3</sub>CN. Se usó el siguiente gradiente por etapa: 25 % B y 75 % A durante 2 minutos, luego 25 % B, 75 % A a 55 % B, 45 % A durante 15 minutos, luego 55 % B, 45 % A a 80 % B, 20 % A durante 3 minutos a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

Método: UPLC22v1

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, 130Å, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm, 40 °C. El sistema UPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen: A: 10 mM TRIS, 15 mM sulfato de amonio, 80 % H<sub>2</sub>O, 20 % CH<sub>3</sub>CN, pH 7,3; B: 80 % CH<sub>3</sub>CN, 20 % H<sub>2</sub>O. 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.

### 3. Método de MALDI-MS

Método: MALDI01v1

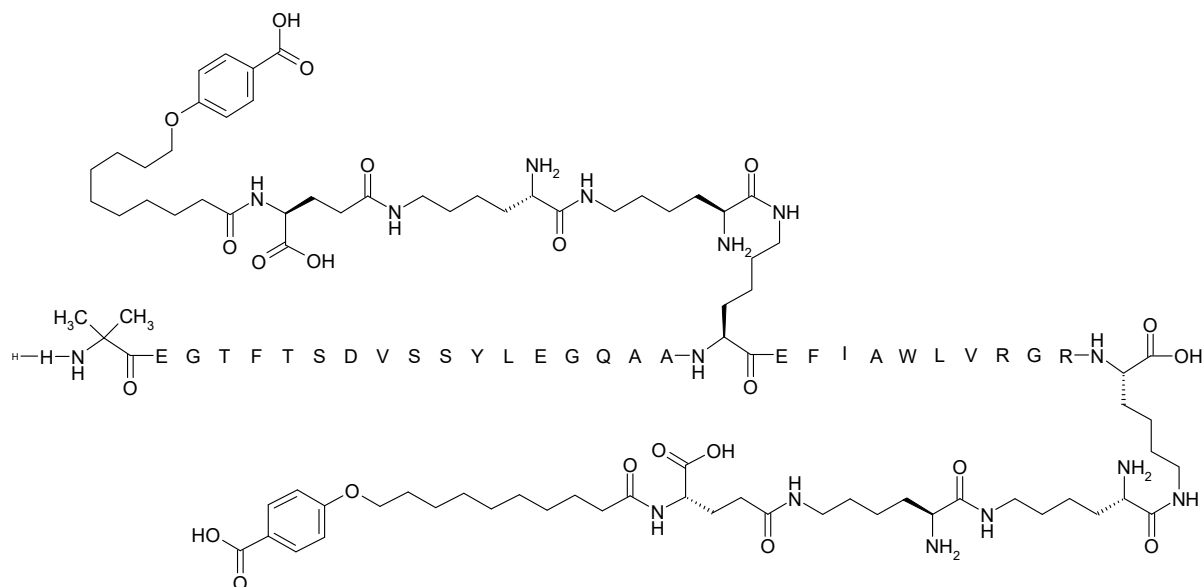
Los pesos moleculares se determinaron mediante el uso de espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de ionización y desorción con láser asistida por matriz (MALDI-MS) y se registraron en un Microflex o Autoflex (Bruker). Se usó una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinámico.

### B. Compuestos ilustrativos

#### Ejemplo 1

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 21:



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

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4820 m/z encontrada: 4817

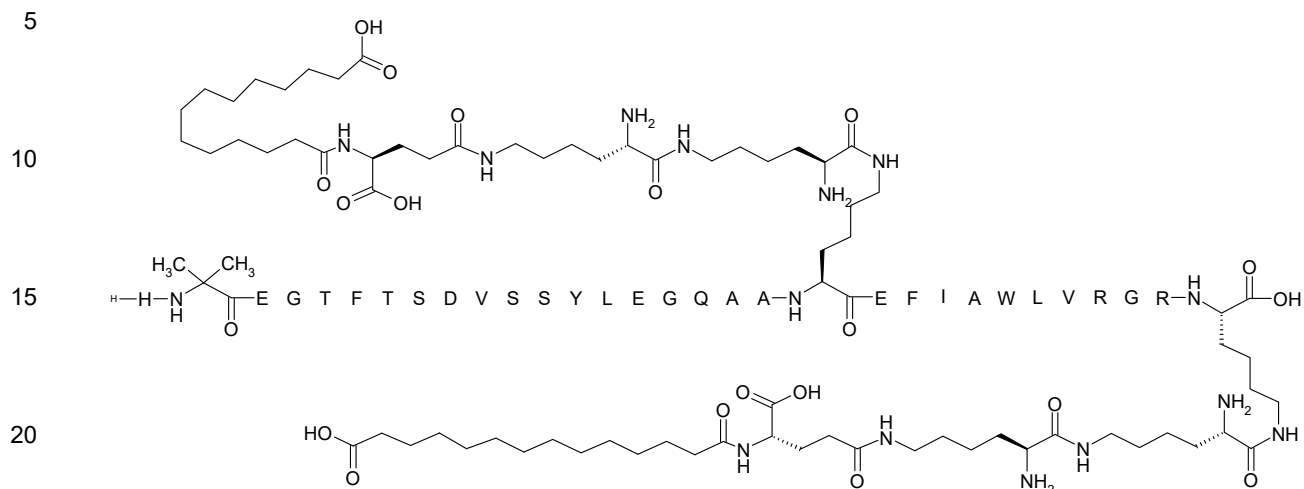
Método de UPLC: UPLC06v1: Rt = 13,7 min

#### Ejemplo 2

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-

carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 22:



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

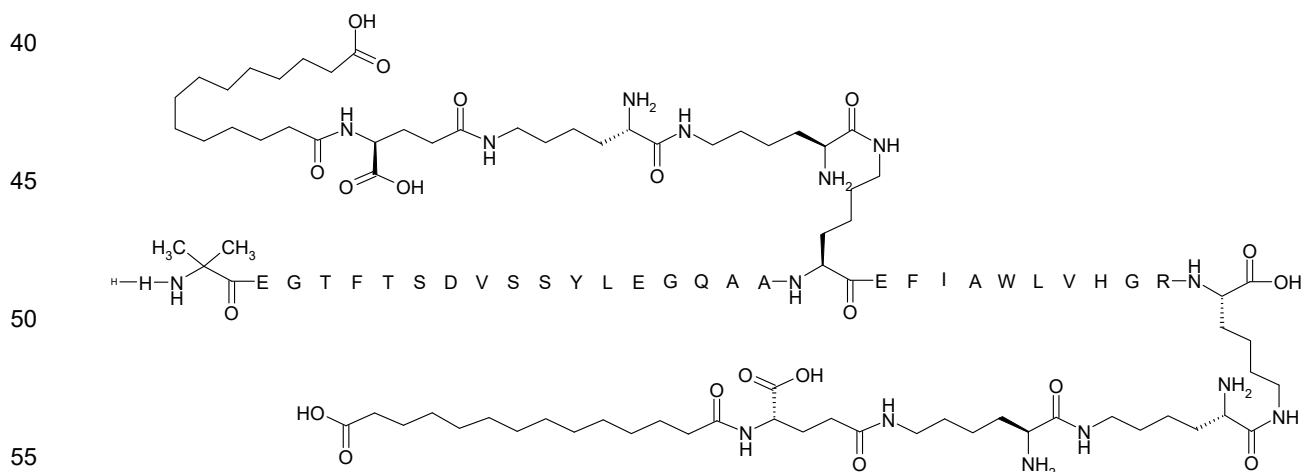
25 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,8 min

Método de UPLC: UPLC06v1: Rt = 13,7 min

30 Ejemplo 3

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 23:



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

60 Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4701,4 m/z encontrada: 4699,6

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,7 min

Método de UPLC: UPLC06v1: Rt = 13,9 min

65 Ejemplo 4





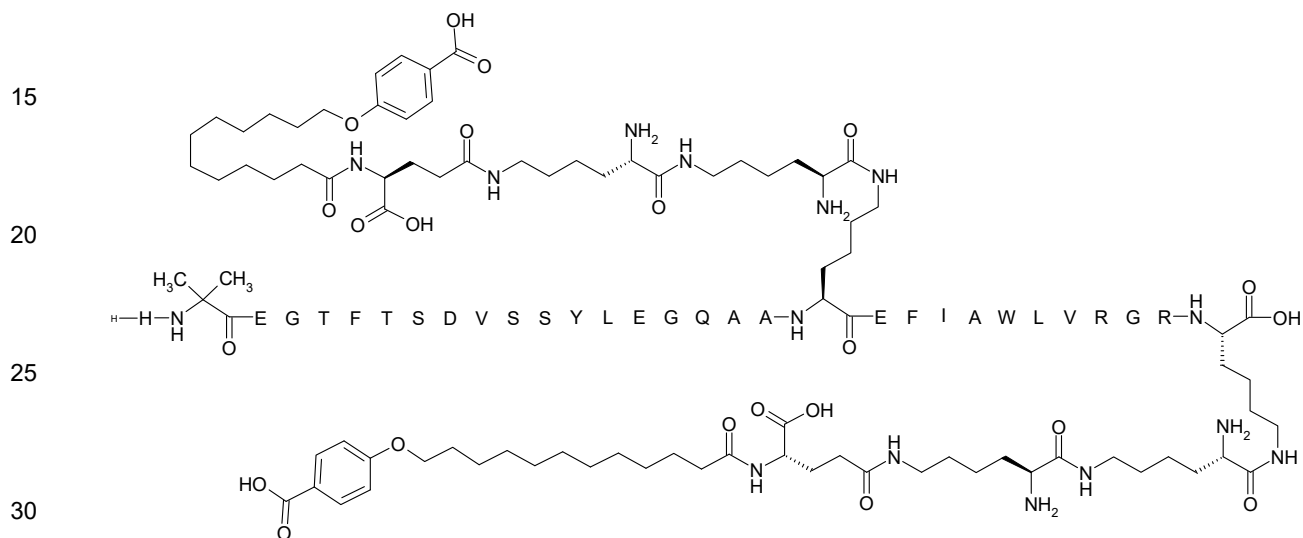


Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,0 min

Ejemplo 7

5 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 27:



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

35 Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4876,7 m/z encontrada: 4875,4

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,4 min

Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 11,9 min

40 Ejemplo 8

45 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

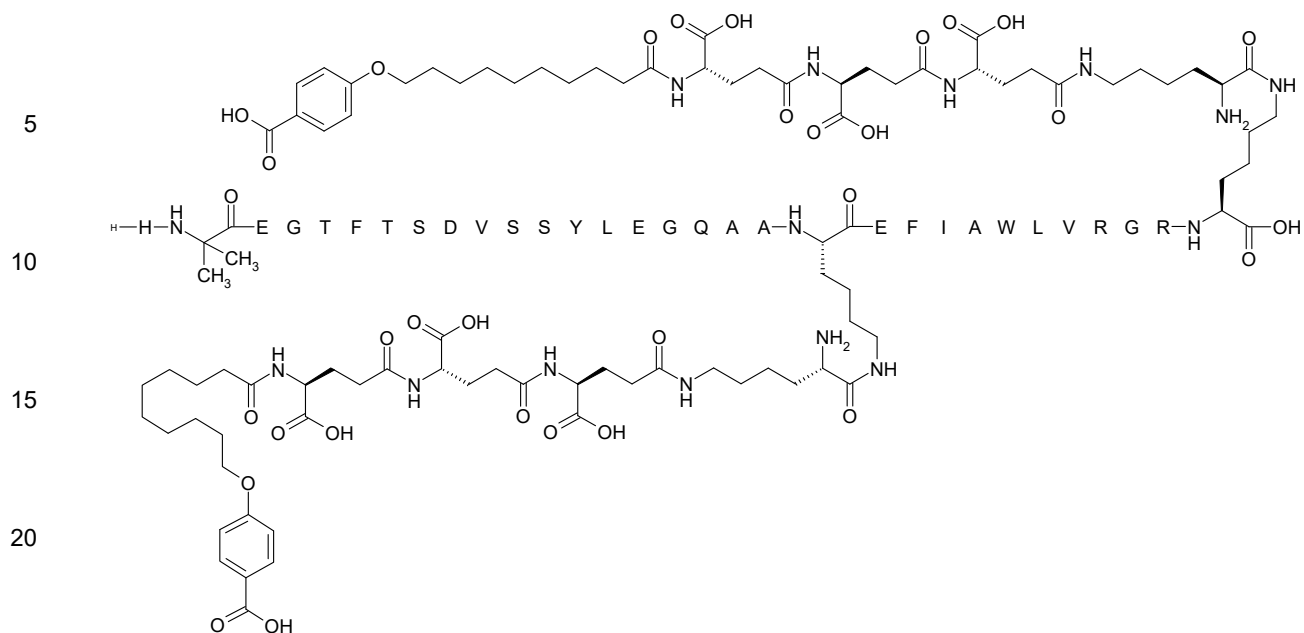
Quím. 28:

50

55

60

65



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

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 5080 m/z encontrada: 5080

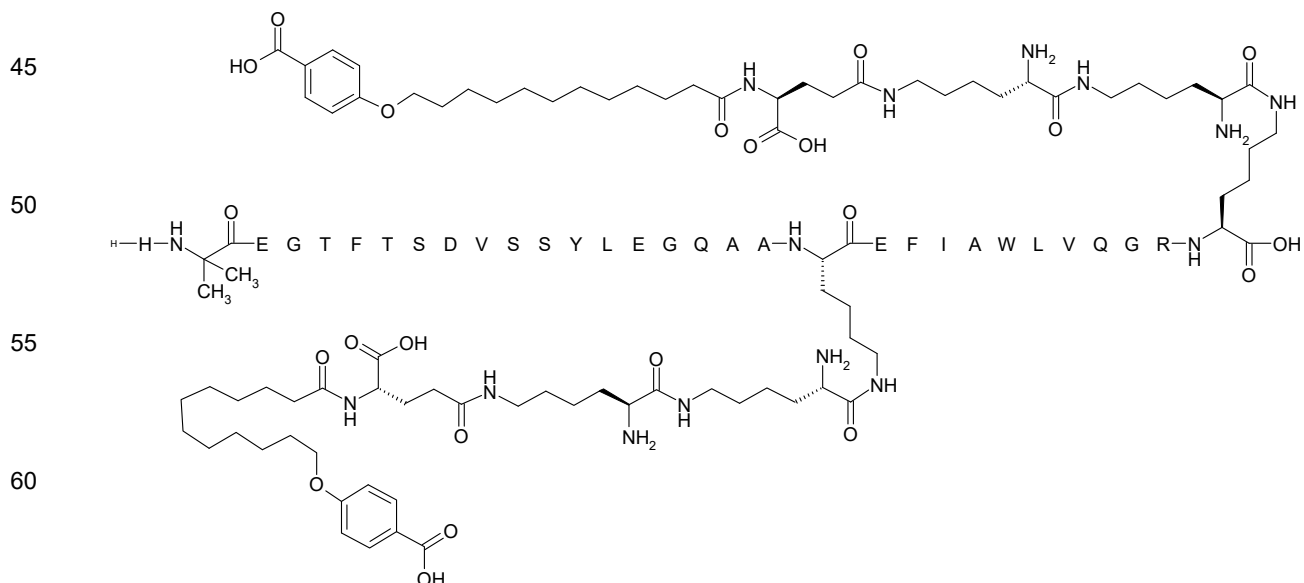
30 Método de UPLC: UPLC06v1: Rt = 14,3 min;

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,8 min

Ejemplo 9

35 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxy-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxy-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>, Gln<sup>34</sup>, Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 29:



65 Método de preparación: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4848 m/z encontrada: 4847

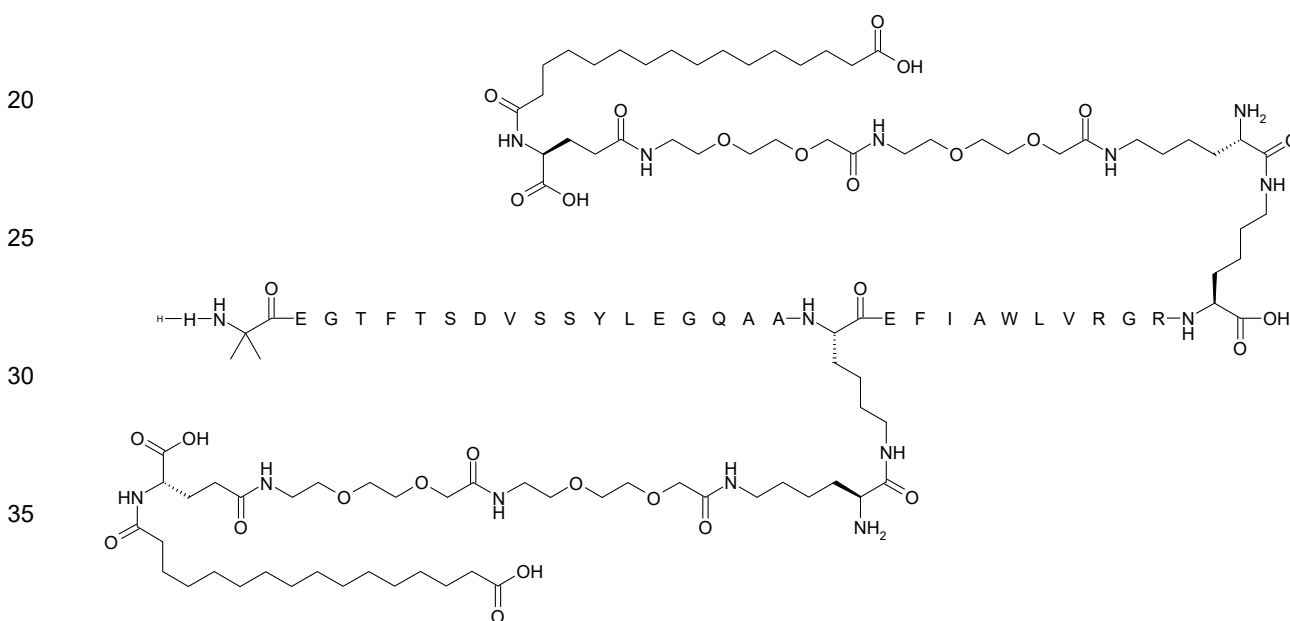
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,4 min

5 Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,8 min

Ejemplo 10

10 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-  
 carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-  
 amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-  
 carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-  
 [Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 30:



Método de preparación: SPPS\_P; SC\_L; SC\_M1; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,27 min; m/3 = 1702; m/4 = 1276; m/5 = 1021

45 Método de UPLC: UPLC02v01: Rt = 8,4 min

Método de UPLC: UPLC07v01: Rt = 12,9 min

Ejemplo 11

50 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-  
 carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-  
 [2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-  
 carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-  
 (7-37)-péptido

Quím. 31:

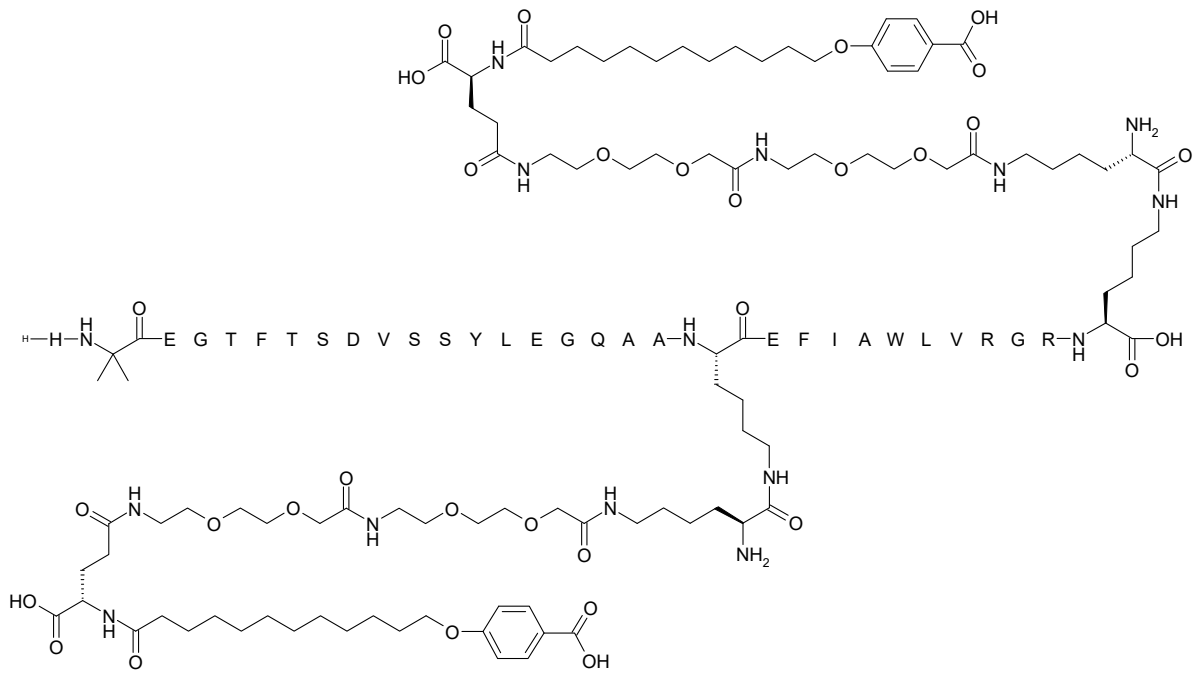
60

65





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



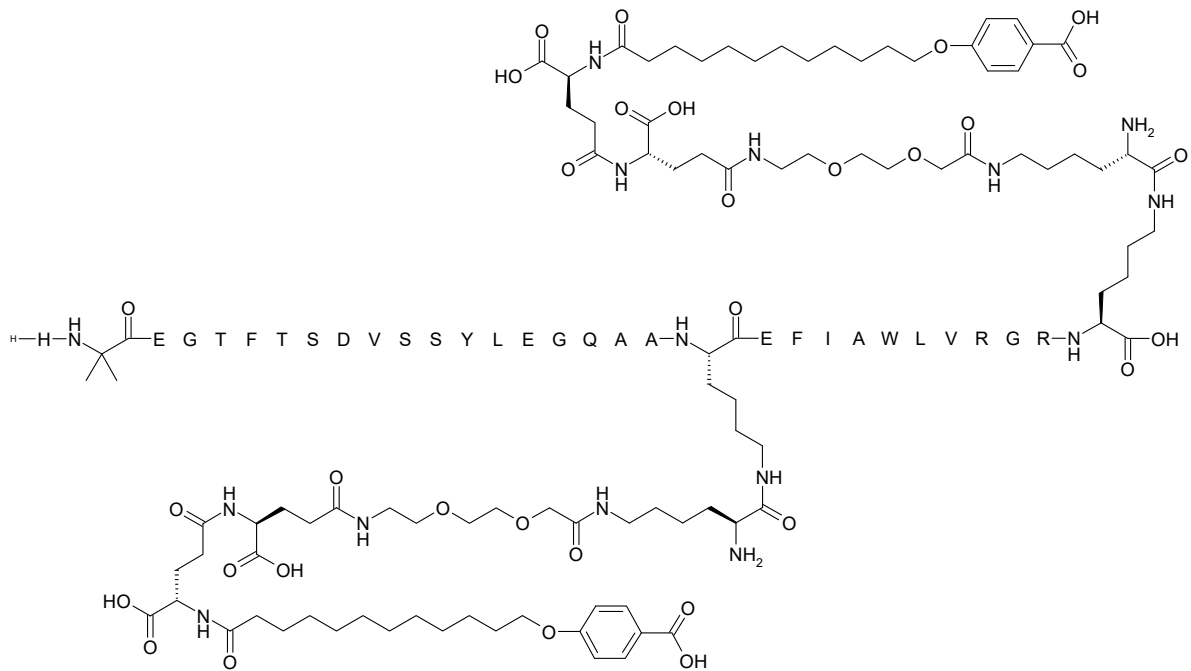
Método de preparación: SPPS\_P; SC\_L; SC\_M1; CP\_M1  
 Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,27 min; m/3 = 1735; m/4 = 1301; m/5 = 1041; m/6 = 868  
 Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,87 min  
 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,72 min

Ejemplo 15  
 $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 35:



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



Método de preparación: SPPS\_P; SC\_L; SC\_M1; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt: 2,24 min; m/3 = 1724; m/4 = 1293; m/5 = 1035; m/6 = 862

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,38 min

Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,87 min

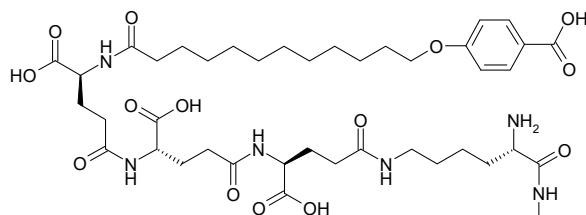
Ejemplo 16

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 36:



5

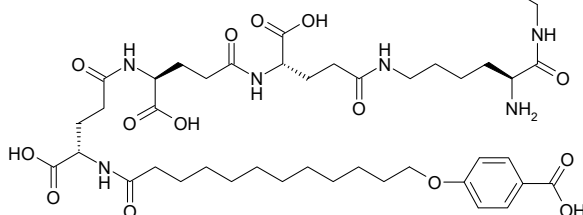


10



15

20



25

Método de preparación: SPPS\_P; SC\_L; SC\_M1; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt: 2,32 min; m/4 = 1285; m/5 = 1028

30

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,28 min

Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,52 min

Ejemplo 18

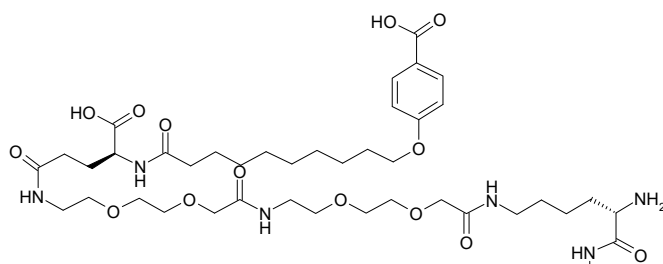
35

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

40

Quím. 38:

45



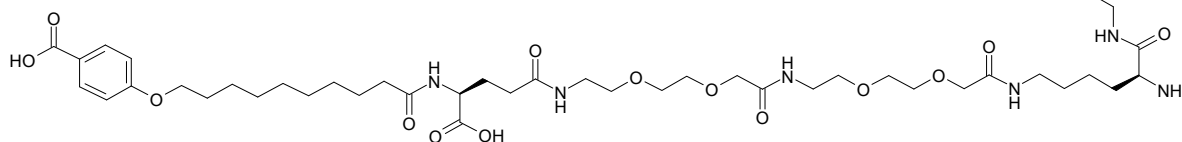
50

55



60

65



Método de preparación: SPPS\_A; SC\_A; CP\_M1

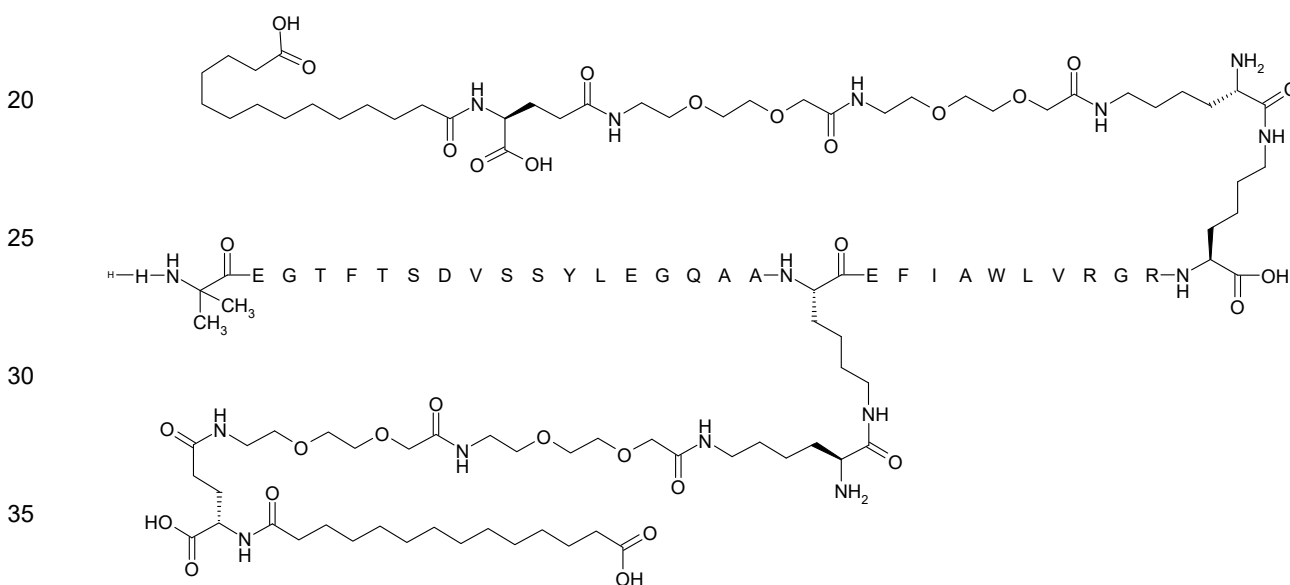
Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,2 min; m/3=1731; m/4=1298; m/5=1039

5 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,2 min

Ejemplo 19

10 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 39:



40 Método de preparación: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 5044,8 m/z encontrada: 5042,5

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,8 min

45 Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 9,8 min

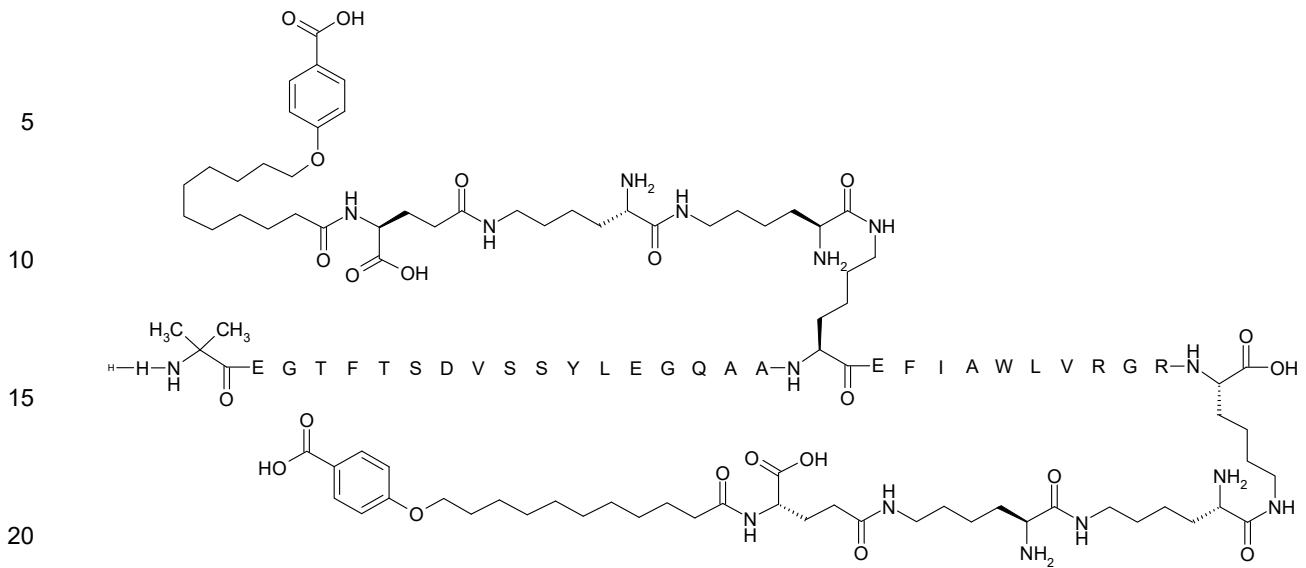
Ejemplo 20

50 N<sup>ε26</sup>[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 40:

60

65



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

25

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4848 m/z encontrada: 4845

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,0 min

30 Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 10,8 min

Ejemplo 21

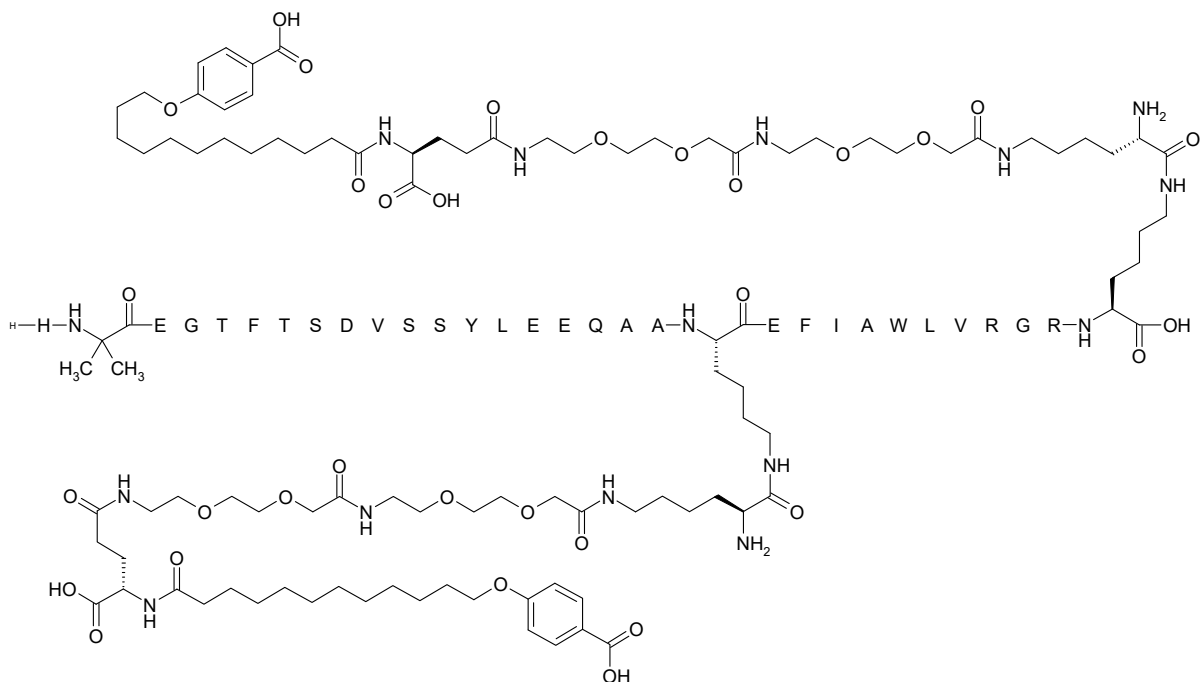
35

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

40

Quím. 41:

45



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

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 5273; m/z encontrada: 5272

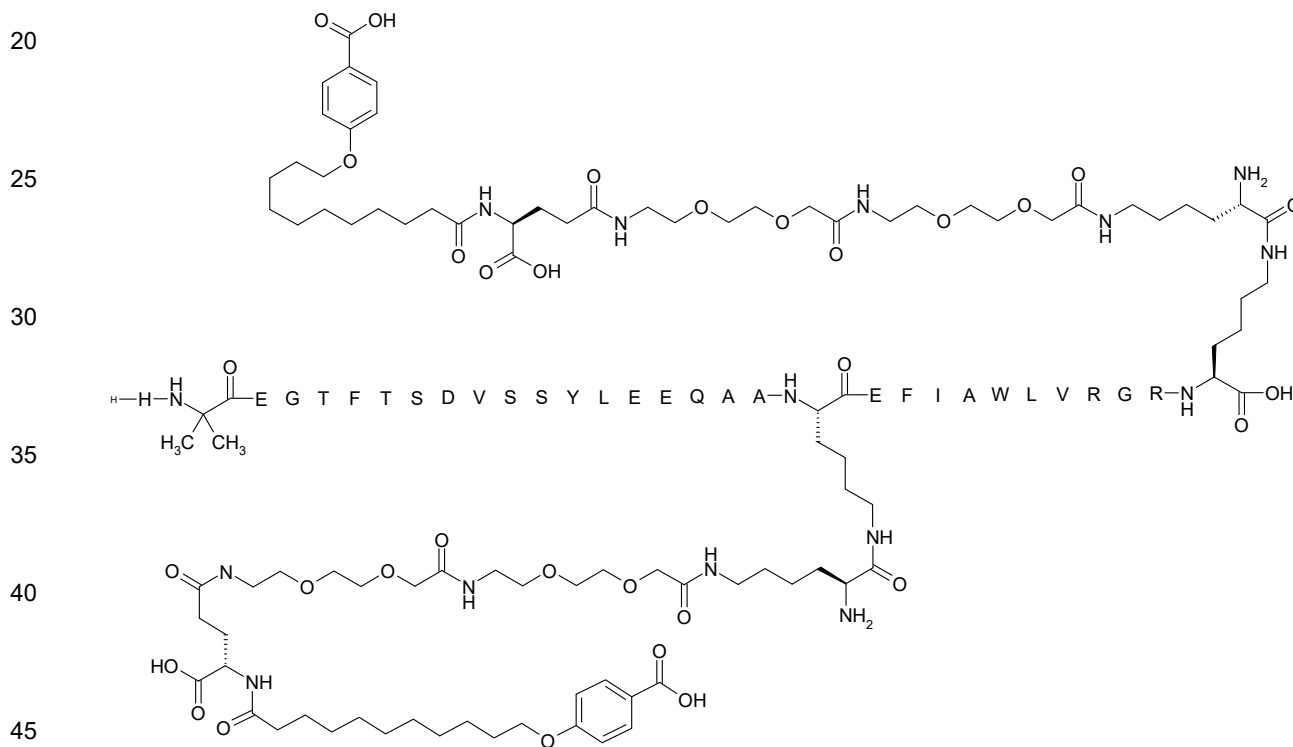
5 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,7 min

Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 12,4 min

Ejemplo 22

10 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-  
15 [Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 42:



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

50 Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 5244,9; m/z encontrada: 5243,4

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,2 min

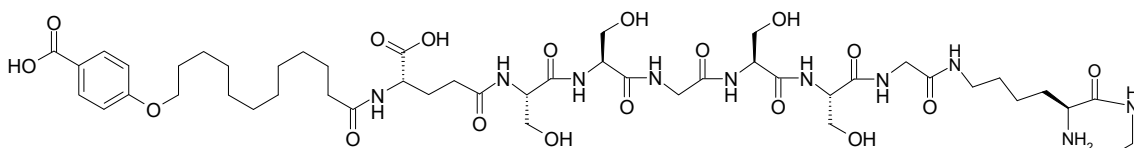
Método de UPLC: UPLC07v1: Rt = 11,1 min

55 Ejemplo 23

60 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]hexanoil]-  
65 [Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 43:

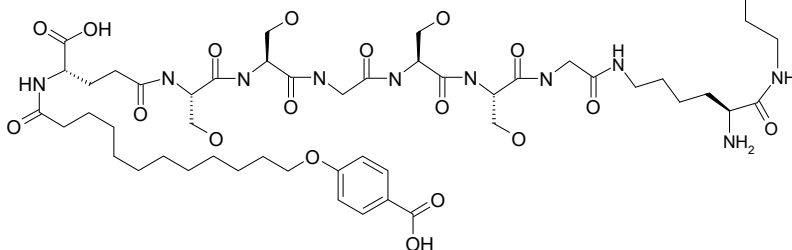
5



10



15



20

25 Método de preparación: SPPS\_A (alternativamente SPPS\_L), SC\_A, CP\_M1

Método de UPLC: B4\_1: Rt = 8,70 min

Método de LCMS: LCMS\_4: Rt = 2,10 min; m/3:1849; m/4:1387; m/5:1110

30

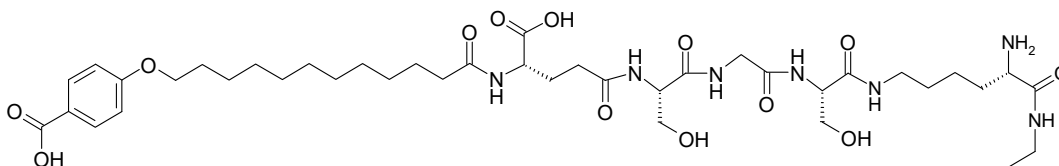
Ejemplo 24

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

35

Quím. 44:

40

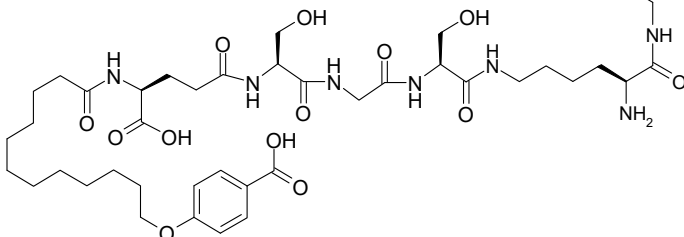


45



50

55



60

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

65

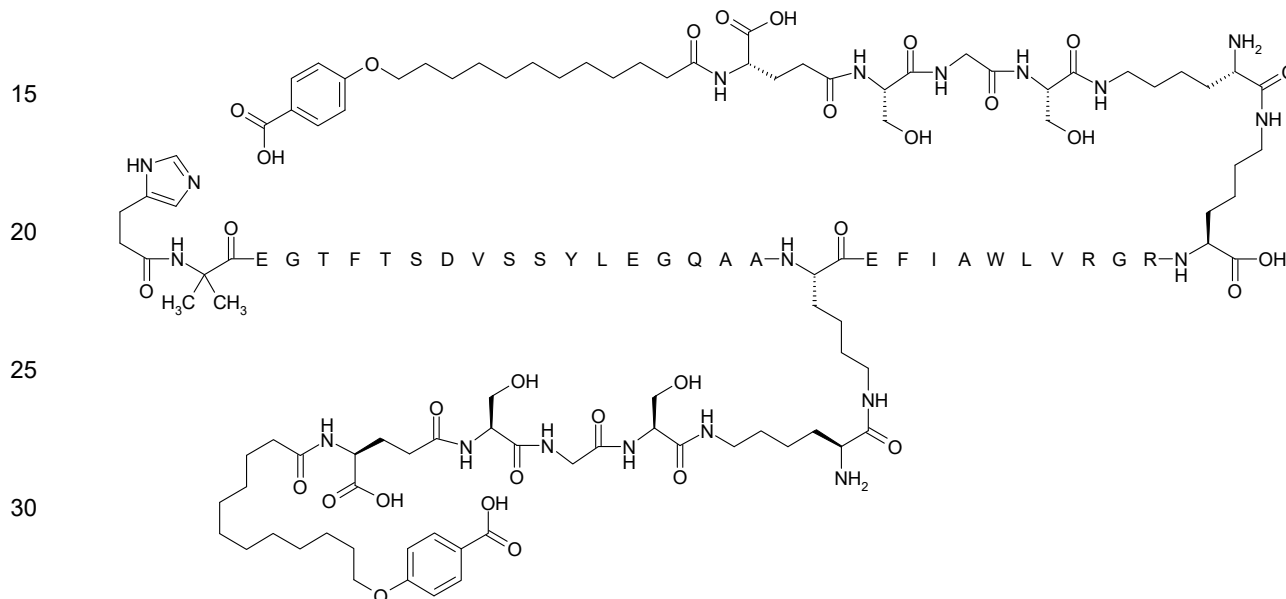
Método de UPLC: AP\_B4\_1: Rt = 8,4 min

Método de LCMS: LCMS\_4: Rt = 2,15 min, m/3 = 1695; m/4 = 1271

Ejemplo 25

5 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]-[Imp<sup>7</sup>,Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 45:



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

Método de UPLC: AP\_B4\_1: Rt = 8,5 min

40 Método de LCMS: LCMS\_4: Rt = 2,2 min, m/3 = 1690; m/4 = 1268

Ejemplo 26

45 N<sup>ε26</sup>-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[8-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]octanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[8-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]octanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

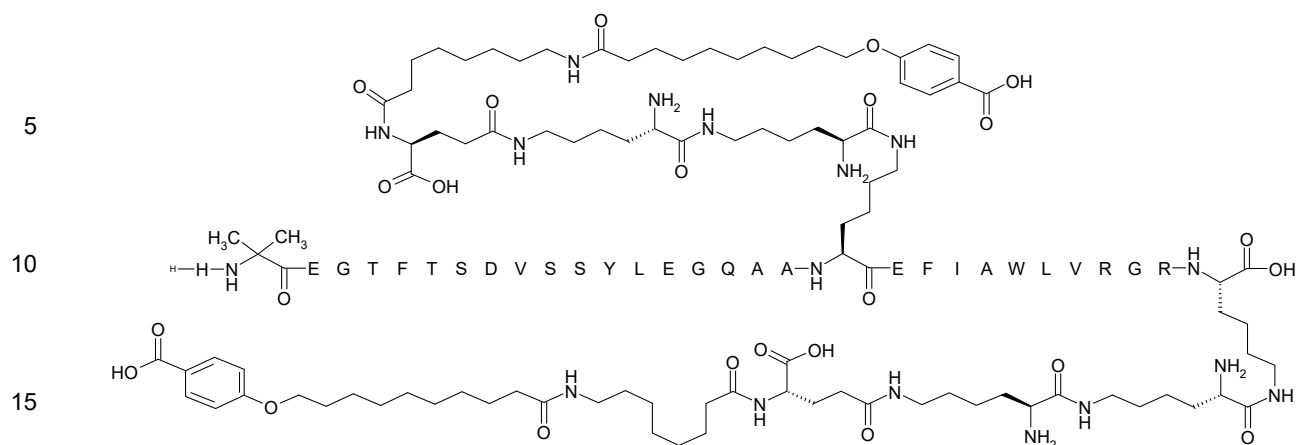
Quím. 46:

55

60

65





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

20

Método de MALDI-MS: MALDI01v01: m/z calculada: 5097, m/z encontrada: 5101

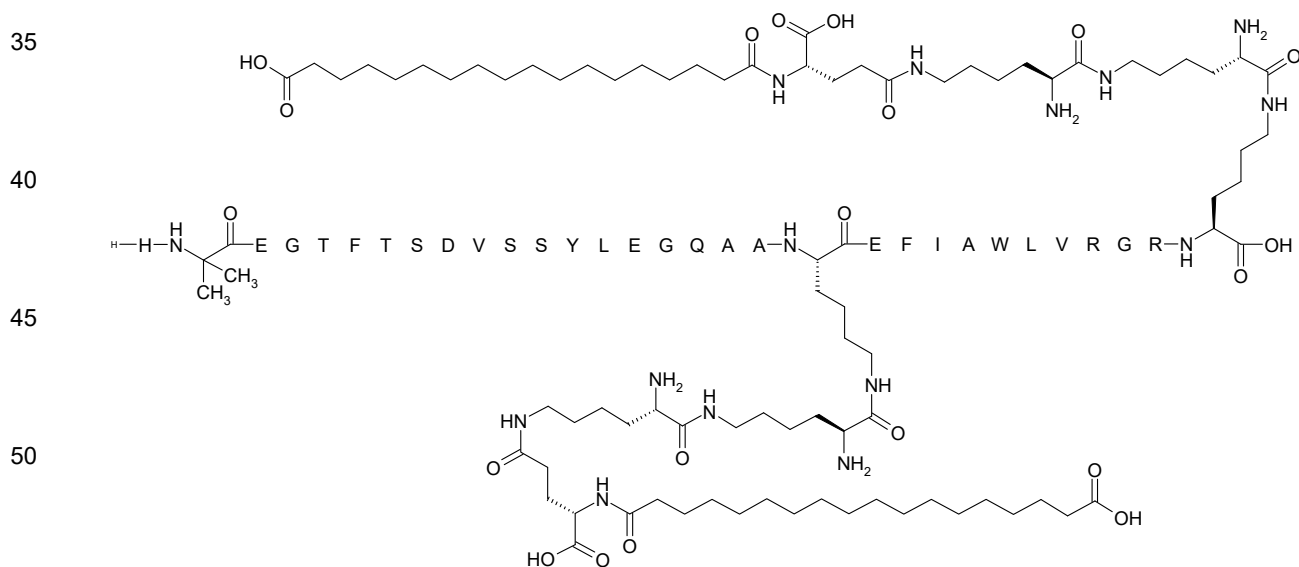
Método de UPLC: B31\_1: Rt = 16,5 min;

25 Ejemplo 27

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

30

Quím. 47:



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

60

Método de MALDI-MS: MALDI01v01: m/z calculada: 4832, m/z encontrada: 4832

Método de UPLC: B4\_1: Rt = 8,8 min

Ejemplo 28

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-

65



Método de preparación: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1 (mediante el uso del compuesto intermedio del Ejemplo 43 en la etapa SC\_P).

Método de LCMS: LCMS\_AP: Rt = 8,46 min, m/z m/3 = 1650, m/4 = 1237, m/5 = 990

5

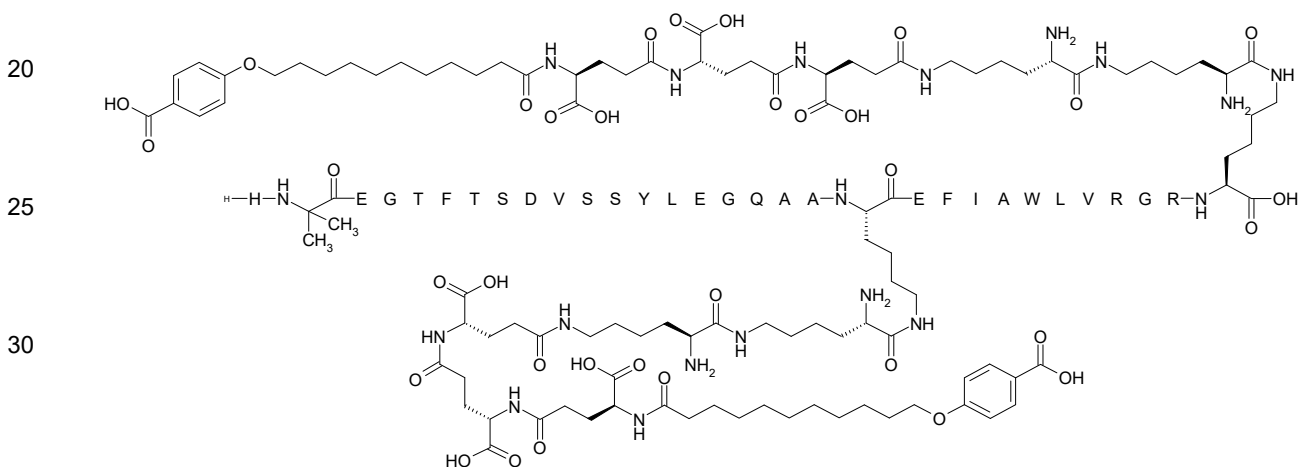
Método de UPLC: UPLC\_AP\_B4\_1: Rt = 8,27 min

Ejemplo 30

10 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

15

Quím. 50:



Método de preparación: SPPS\_M; SC\_M; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS\_AP: Rt = 4,52 min, m/z: m/3 = 1789, m/4 = 1342

40

Método de UPLC: UPLC\_AP\_B4\_1: Rt = 7,63 min

Ejemplo 31

45 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>31</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

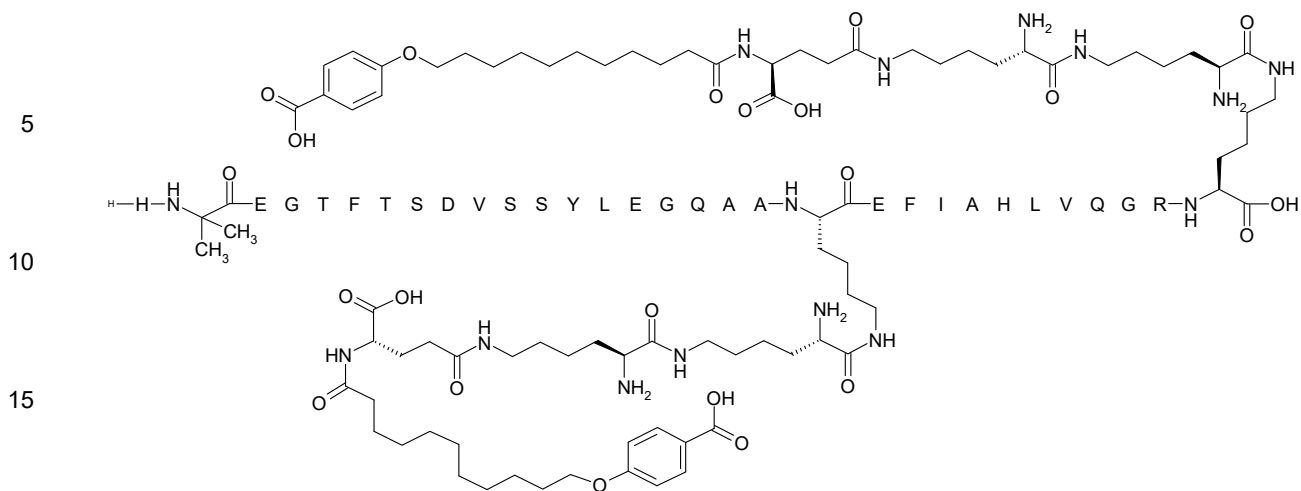
50

Quím. 51:

55

60

65



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

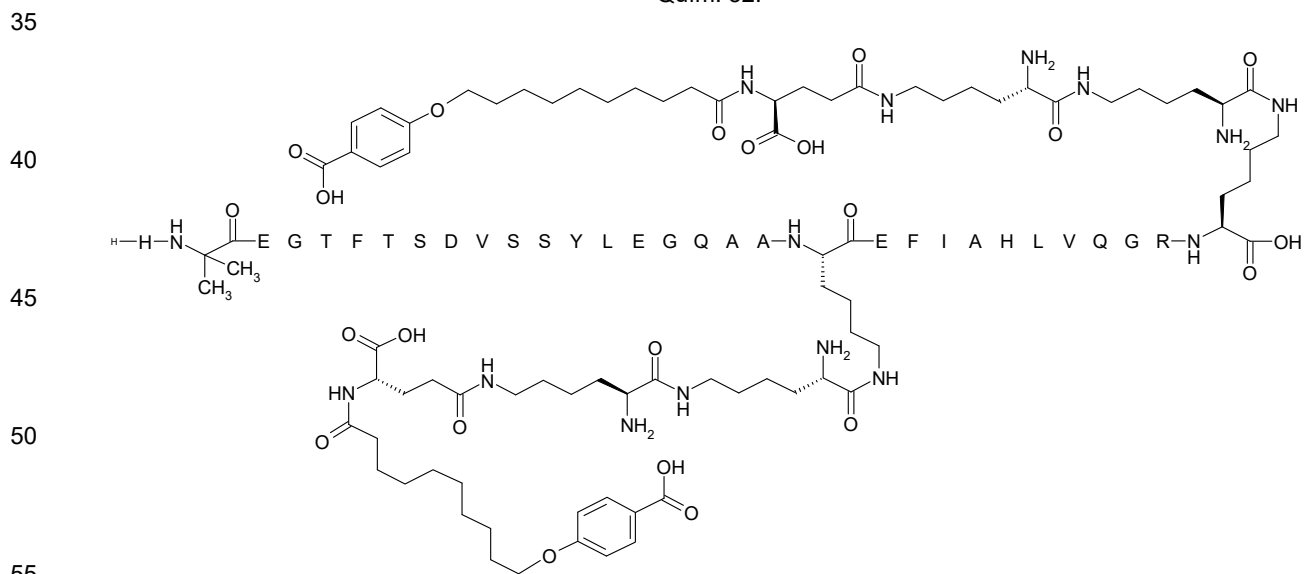
Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4771,5, m/z encontrada: 4771,6

25 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,5 min

Ejemplo 32

30  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>31</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 52:



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

Método de MALDI: MALDI01v1: m/z calculada: 4743,4, m/z encontrada: 4743,3

60 Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,2 min

Ejemplo 33

65  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanolamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]

I], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanolamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

5

Quím. 53:

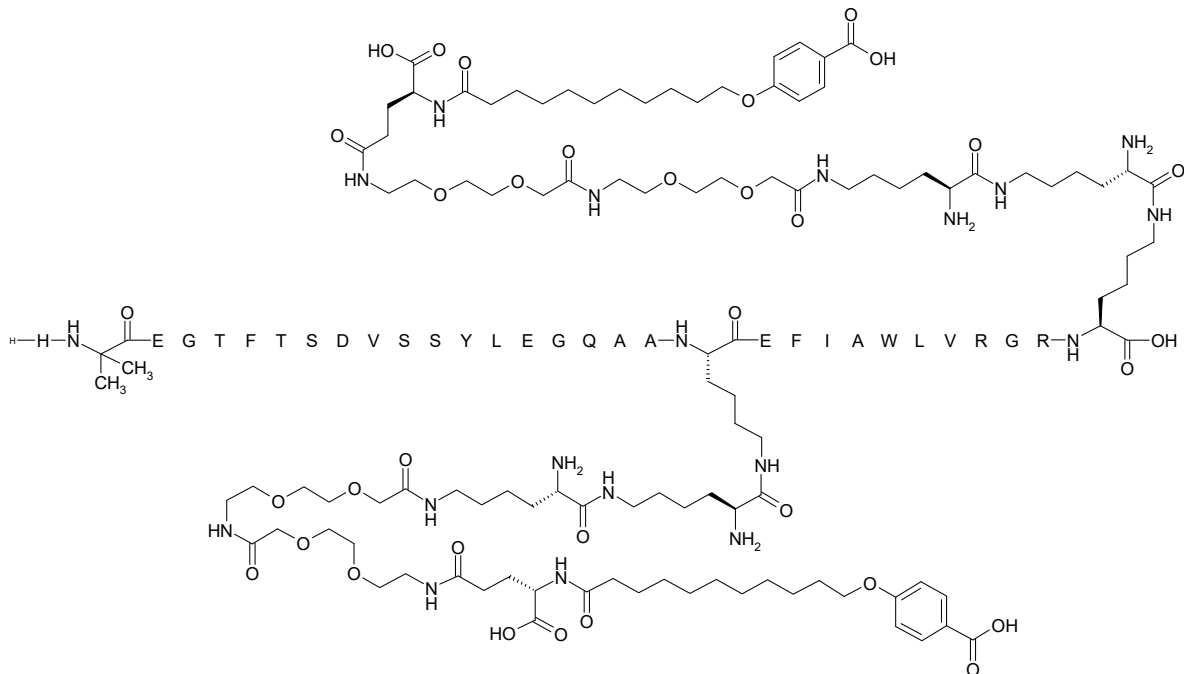
10

15

20

25

30



Método de preparación: SPPS\_L; SC\_L; CP\_M1

35

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,0 min; m/z: m/4 = 1358, m/5 = 1087

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,7 min

Ejemplo 34

40

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

45

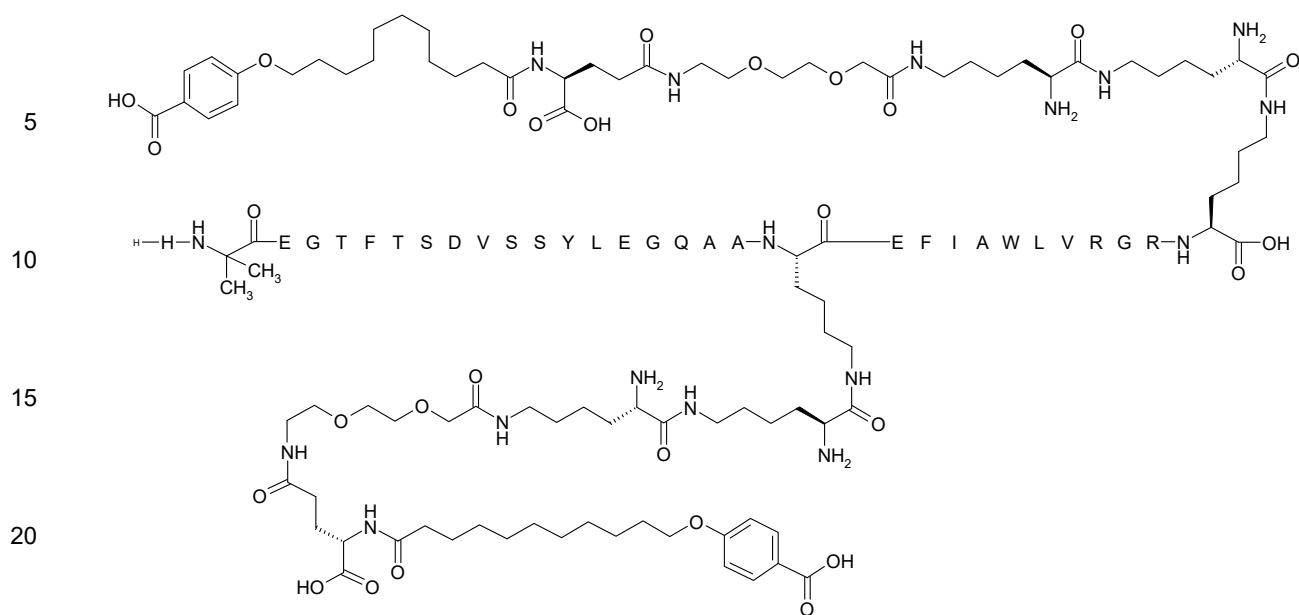
Quím. 54:

50

55

60

65



25 Método de preparación: SPPS\_L; SC\_L; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,0 min; m/z: m/3 = 1714, m/4 = 1285, m/5 = 1029

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,7 min

30

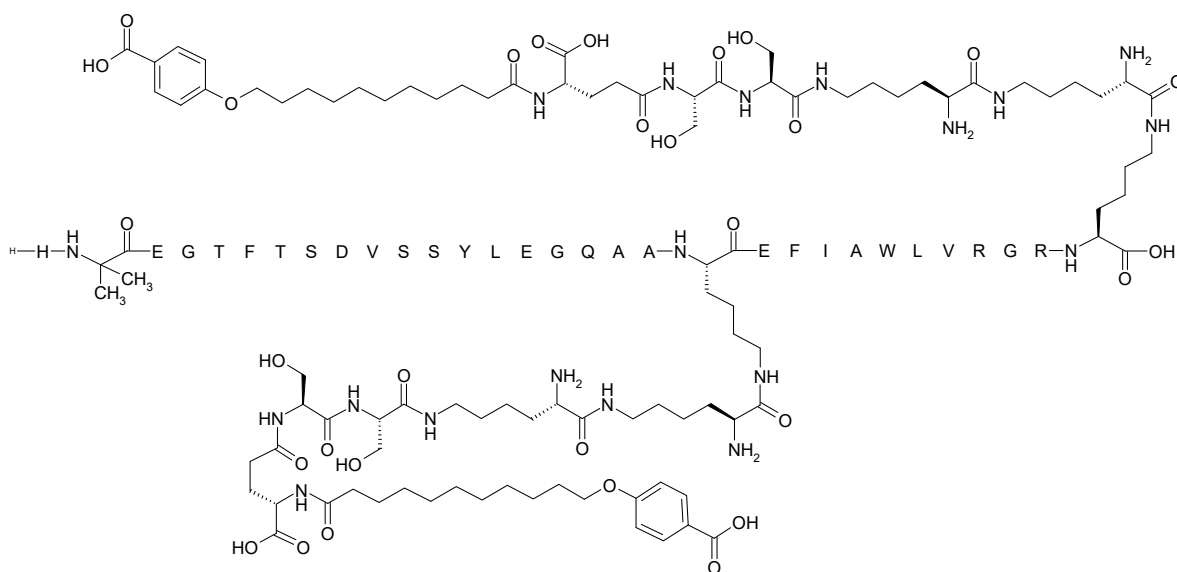
Ejemplo 35

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

35

Quím. 55:

40



Método de preparación: SPPS\_L; SC\_L; CP\_M1

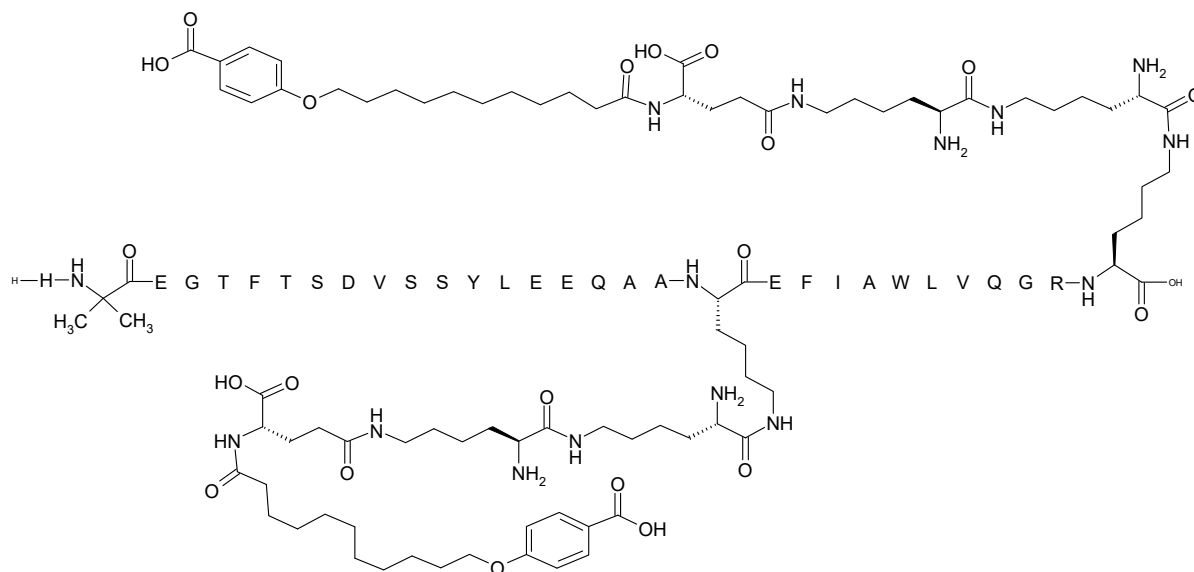
65 Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,0 min; m/z: m/3 = 1733, m/4 = 1300, m/5 = 1040

Método de UPLC: UPLC22v1: Rt = 5,83 min

Ejemplo 36

5 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 56:



35 Método de preparación: SPPS\_L; SC\_L; CP\_M1

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,0 min; m/z: m/3 = 1632, m/4 = 1224, m/5 = 979, m/6 = 816

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,8 min

Ejemplo 37

45 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 57:

50

55

60

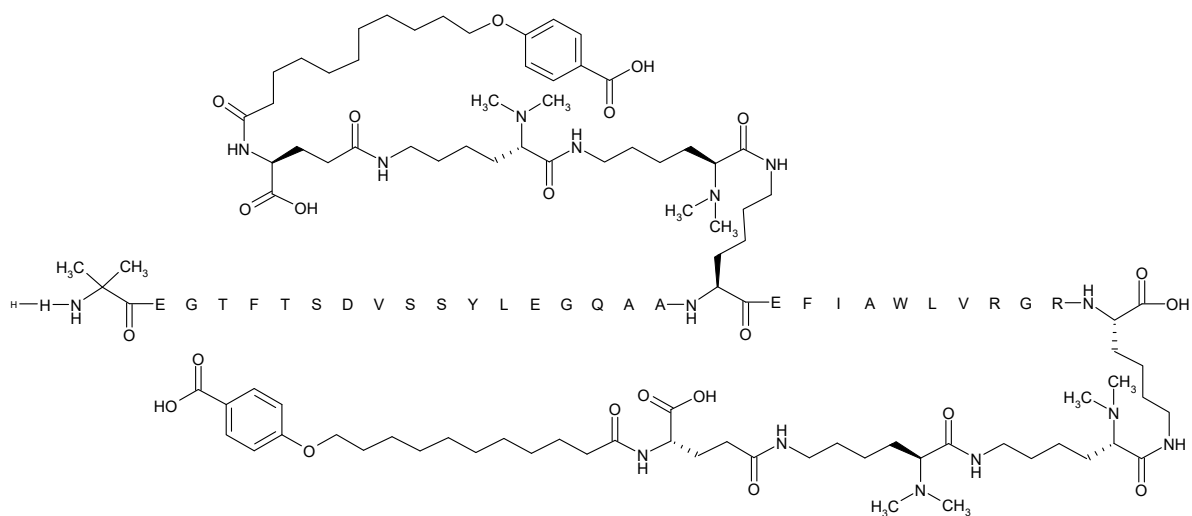
65

5

10

15

20



Método de preparación: SPPS\_P; SC\_P; CP\_M1 (mediante el uso del compuesto intermedio del Ejemplo 43 en la etapa SC\_P).

25 Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,50 min; m/z: m/4 = 1241, m/5 = 993, m/6 = 827

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 6,5 min

Ejemplo 38

30

$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

35

Quím. 58:

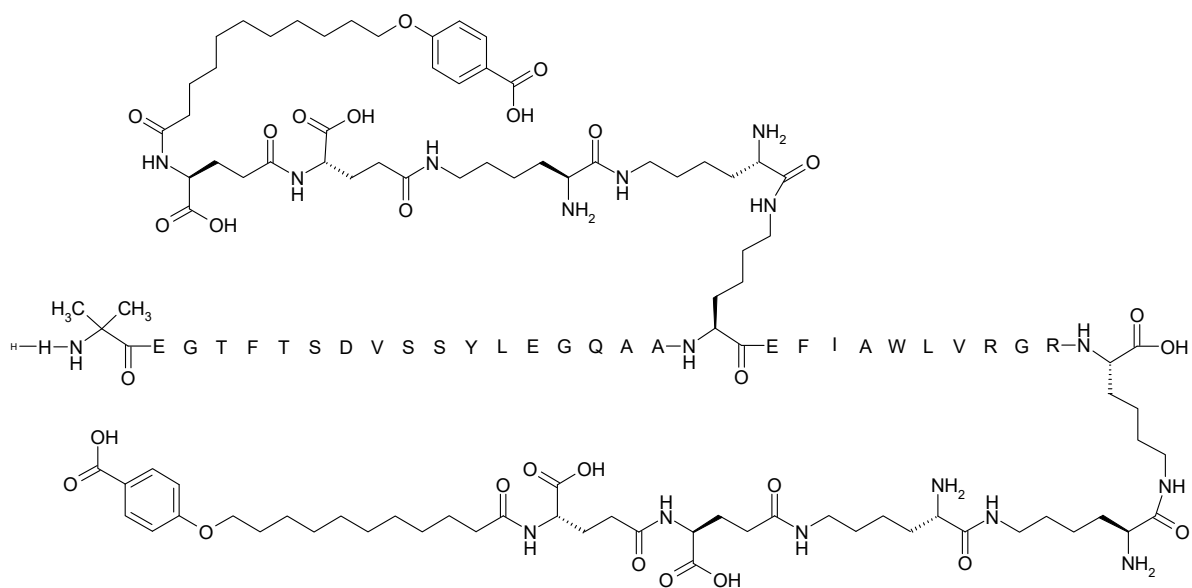
40

45

50

55

60



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

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2 min; m/z: m/3 = 1986, m/4 = 1277, m/5 = 1022

65

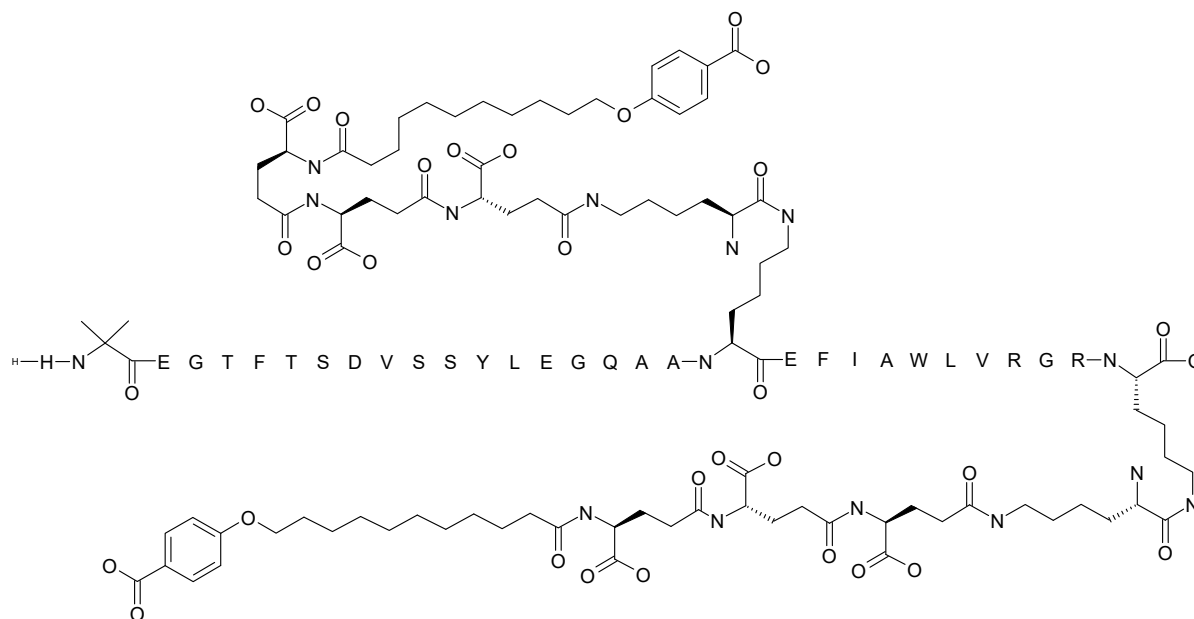
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 7,77 min



Ejemplo 39

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 59:



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

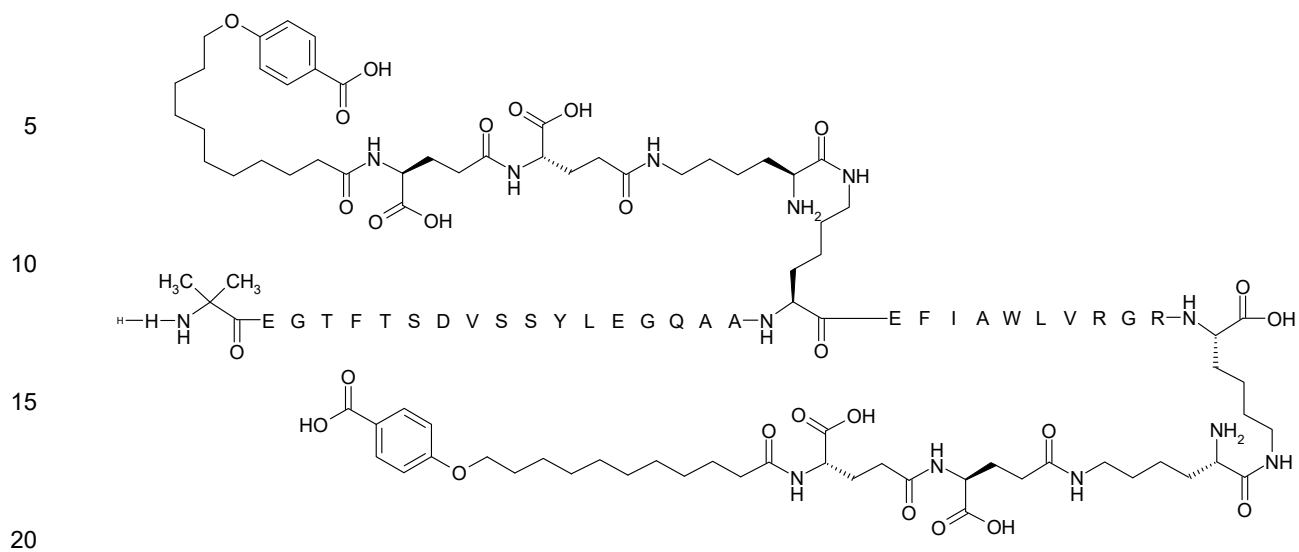
Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,68 min; m/z: m/3 = 1704, m/4 = 1278

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,00 min

Ejemplo 40

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

Quím. 60:



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

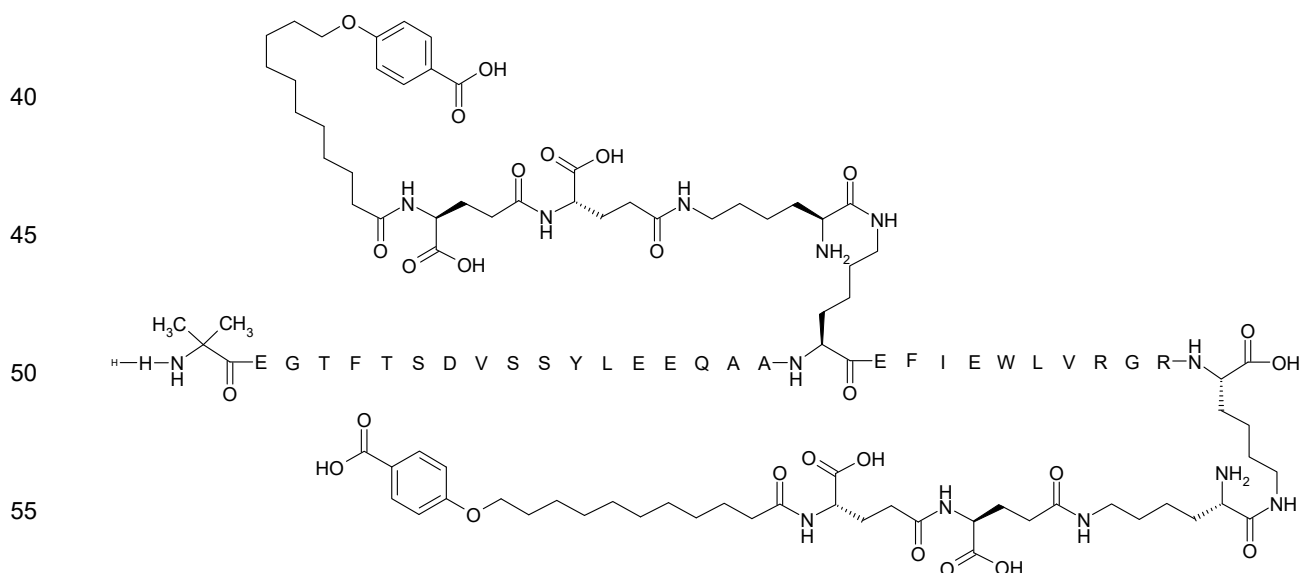
Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,70 min; m/z: m/3 = 1617, m/4 = 1213, m/5 = 971

Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,2 min

Ejemplo 41

30 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Glu<sup>30</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido

35 Quím. 61:



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

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,17 min; m/z: m/3 = 1661, m/4 = 1246, m/5 = 997

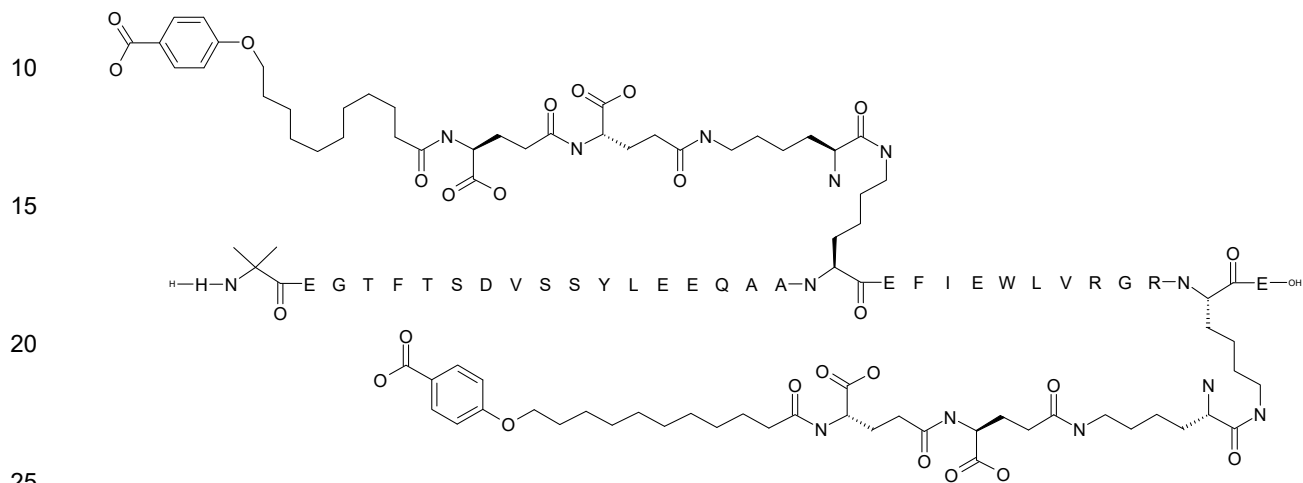
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,27 min

65 Ejemplo 42

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Glu<sup>30</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu

5

Quím. 62:



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

Método de LCMS: LCMS01v1: Rt = 2,18 min; m/z: m/3 = 1703, m/4 = 1278, m/5 = 1022

30

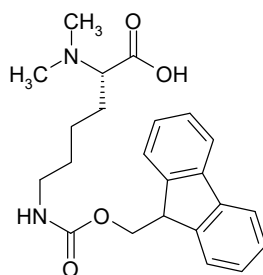
Método de UPLC: UPLC02v1: Rt = 8,24 min

Ejemplo 43

35 Ácido (S)-2-Dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-hexanoico

Quím. 63:

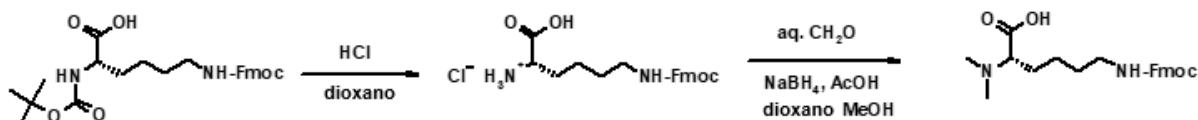
40



50

El compuesto del Quím. 63 se prepara de la siguiente manera (más detalladamente a continuación):

55



60 El material de partida, ácido (S)-2-terc-Butoxicarbonilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-hexanoico (Novabiochem F04-12-0069; 28,0 g, 59,8 mmol), se suspendió en 1,4-dioxano (800 ml) y se añadió una solución de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (7,2 M, 500 ml) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego se filtró y se lavó cuidadosamente con 1,4-dioxano y dietiléter antes de secarse al vacío. El clorhidrato del ácido (S)-2-amino-6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico se obtuvo como un sólido blanco.

65

Rendimiento: 23,58 g (96 %)

NMR: Espectro <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>, dH): 7,80 (d, J=7,4 Hz, 2 H); 7,64 (d, J=7,4 Hz, 2 H); 7,47-7,25 (m, 4 H); 4,58-4,29 (m, 2 H); 4,14-4,25 (m, 1 H); 3,95 (t, J=6,3 Hz, 1 H); 3,19-2,73 (m, 2 H); 2,09-1,71 (m, 2 H); 1,65-1,14 (m, 4 H)

El producto de la reacción anterior (13,1 g, 32,4 mmol) y una solución acuosa de formaldehído (aprox. al 35 %, 13,2 ml) se disolvieron en una mezcla de 1,4-dioxano/metanol (300 ml, 1:1) y la solución resultante se enfrió hasta 0 °C. Después, se añadió cuidadosamente borohidruro de sodio (5,50 g, 145 mmol) en tres porciones dentro de los 15 minutos y el pH de la mezcla de reacción se ajustó por adición de ácido acético (14,4 ml) a pH 5,5. Después se añadió una segunda porción de formaldehído acuoso (aprox. al 35 %, 13,2 ml) en la mezcla de reacción y otra parte de borohidruro de sodio (5,50 g, 145 mmol) se añadió cuidadosamente en tres porciones. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante otros 60 minutos. El análisis de HPLC-MS reveló la conversión completa del material de partida por lo tanto la reacción se inactivó mediante la adición de solución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (aprox. 20 ml) hasta pH 7,0. Luego la mezcla de reacción se diluyó con solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se extrajo con cloroformo (5 x 500 ml). Las fracciones que contenían el producto deseado (TLC) se recogieron y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Luego se filtró la solución y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El producto bruto se disolvió en cloroformo caliente (300 ml) y se añadió una mezcla de dietiléter/hexano (2:1, 700 ml). El precipitado formado se filtró, se lavó con dietiléter antes de secarse al vacío para dar el compuesto del título como un polvo blanco.

Rendimiento: 14,26 g

LC-MS (Sunfire 4,6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua 35:65 a 100:0 + FA al 0,1 %): Rt = 3,71 min

LC-MS m/z: 397,4 (M+H)+.

El producto bruto recolectado (36,5 g) de 3 lotes del anterior se sometió a cromatografía en columna RP (Cromasil C18, 100Å, 13 µm, 7,5 x 41 cm, velocidad de flujo 200 ml/min, acetonitrilo/agua 20:80 a 45:55, detección UV 220 nm). Las fracciones que contienen el producto se recogieron y se liofilizaron. Se obtuvo el ácido (S)-2-Dimetilamino-6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoico como un polvo blanco fino.

Rendimiento: 20,21 g

NMR: Espectro <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, AcOD-d<sub>4</sub>, dH): 7,87-7,72 (m, 2 H); 7,70-7,57 (m, 2 H); 7,53-7,20 (m, 4 H); 4,66-4,36 (m, 2 H); 4,35-4,12 (m, 1 H); 3,98-3,77 (m, 1 H); 3,32-3,10 (m, 2 H); 2,95 (s, 6 H); 2,16-1,73 (m, 2 H, superpuesto); 1,69-1,16 (m, 4 H)

LC-MS (Sunfire 4,6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua 35:65 a 100:0 + FA al 0,1 %): Rt = 3,11 min

LC-MS m/z: 397,2 (M+H)+

Este producto intermedio puede usarse en la síntesis de los compuestos de los Ejemplos 29 y 37 y otros compuestos con el mismo conector.

#### Métodos farmacológicos

##### Ejemplo 44: Potencia in vitro (AlphaScreen - membranas)

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

Se determinaron las potencias de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-21 y 23 como se describe a continuación, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (AMPC) en un medio que contiene membranas que expresan el receptor de GLP-1 humano.

#### Principio

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

#### Cultivo celular y preparación de membranas

## ES 2 770 599 T3

Una línea celular transfectada estable y un clon de alta expresión se seleccionaron para tamizaje. Las células se cultivaron a CO<sub>2</sub> al 5 % en DMEM, FCS al 5 %, Pen/Strep (penicilina/estreptomocina) al 1 % y 0,5 mg/ml del marcador de selección G418.

- 5 Las células a una confluencia aproximada del 80 % se lavaron 2 veces con PBS y se cosecharon con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Todas las etapas adicionales se llevaron a cabo en hielo. El sedimento celular se homogeneizó mediante Ultrathurax durante 20-30 segundos en 10 ml de Tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH = 7,4), se centrifugó 15 minutos a 20 000 rpm y el sedimento se resuspendió en 10 ml de Tampón 2 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 7,4). La suspensión se homogeneizó durante 20-30 segundos y se centrifugó durante 15 minutos a 20 000 rpm. La suspensión en Tampón 2, homogeneización y centrifugación se repitieron una vez y las membranas se resuspendieron en Tampón 2. Se determinó la concentración de proteínas y las membranas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.
- 10
- 15 El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (núm. de catálogo de Costar: 3693). El volumen final por pocillo fue de 50 µl.

### Soluciones y reactivos

- 20 Estuche AlphaScreen cAMP Assay de Perkin Elmer Life Sciences (núm. de catálogo: 6760625M); que contiene perlasceptoras de anti-AMPC (10 U/µl), perlas donantes de Estreptavidina (10 U/µl) y AMPC biotinilado (133 U/µl).

25 Tampón de AlphaScreen, pH=7,4: 50 mM TRIS-HCl (Sigma, núm. de catálogo: T3253); 5 mM HEPES (Sigma, núm. de catálogo: H3375); 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (Merck, núm. de catálogo: 5833); 150 mM NaCl (Sigma, núm. de catálogo: S9625); Tween al 0,01 % (Merck, núm. de catálogo: 822184). Lo siguiente se añadió al Tampón de AlphaScreen antes de su uso (concentraciones finales indicadas): BSA (Sigma, núm. de catálogo A7906): 0,1 %; IBMX (Sigma, núm. de catálogo: I5879): 0,5 mM; ATP (Sigma, núm. de catálogo: A7699): 1 mM; GTP (Sigma, núm. de catálogo: G8877): 1 µM.

- 30 Estándar de AMPC (factor de dilución en ensayo = 5): Solución de AMPC: 5µl de una solución concentrada de 5 mM AMPC + 495 µl de Tampón de AlphaScreen.

35 La serie de dilución adecuada en Tampón de AlphAscreen se preparó del estándar de AMPC así como el derivado o análogo de GLP-1 a probar, por ejemplo las siguientes ocho concentraciones del compuesto GLP-1: 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-13</sup> y 10<sup>-14</sup> M, y una serie de, por ejemplo, 10<sup>-6</sup> a 3x10<sup>-11</sup> de AMPC.

### Membrana/Perlasceptoras

40 Las membranas se prepararon a partir de células hGLP-1/ BHK 467-12A con una concentración de 6 µg/pocillo correspondiente a 0,6 mg/ml (la cantidad de membranas usadas por pocillo puede variar)

“No membranas”: Perlasceptoras (15µg/ml final) en Tampón de AlphaScreen

45 “6 µg/membranas de pocillos”: membranas + perlasceptoras (15µg/ml final) en Tampón de AlphaScreen

Una alícuota (10 µl) de “No membranas” se añadió al estándar de AMPC (por pocillo en pocillos duplicados) y a los controles positivo y negativo

50 Una alícuota (10 µl) de “6 µg/membranas de pocillos” se añadió al GLP-1 y análogos (por pocillo en pocillos duplicados o triplicados)

Control positivo: 10 µl de “no membranas” + 10 µl de Tampón de AlphaScreen

55 Control negativo: 10 µl de “no membranas” + 10 µl de solución concentrada de AMPC (50µM)

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

### Procedimiento

- 60
1. Hacer el Tampón de AlphaScreen.
  2. Disolver y diluir GLP-1/análogos/estándar de AMPC en Tampón de AlphaScreen.
  - 65 3. Hacer la solución de perlas donantes mediante la mezcla de perlas donantes de estreptavidina (2 unidades/pocillo) y AMPC biotinilado (1,2 unidades/pocillo) e incubar 20-30 min en la oscuridad a temperatura ambiente

4. Añadir el AMPc/GLP-1/análogos a la placa: 10 µl por pocillo.
5. Preparar la solución de membrana/perlas aceptoras y añadir esto a las placas: 10 µl por pocillo.
6. Añadir las perlas donantes: 30 µl por pocillo.
7. Envolver la placa en papel de aluminio e incubar en el agitador durante 3 horas (muy lentamente) a RT.
8. Contar en AlphaScreen – cada placa se incuba previamente en el AlphaScreen durante 3 minutos antes del recuento.

#### Resultados

Los valores de EC<sub>50</sub> [pM] se calcularon mediante el uso del programa informático Graph-Pad Prism (versión 5) y se muestran en la Tabla 1 a continuación. La potencia de todos derivados in vitro se confirmó.

Tabla 1: Potencia in vitro (AlphaScreen)

Compuesto de Ejemplo núm.	EC <sub>50</sub> /pM
1	59
2	44
3	48
4	83
5	33
6	634
7	136
8	34
9	116
10	492
11	426
12	227
13	385
14	280
15	155
16	154
17	286
18	75
19	57
20	71
21	369
23	252
26	135
27	3685
28	7250

Todos los derivados excepto dos tuvieron una buena potencia in vitro correspondiente a un valor de EC<sub>50</sub> por debajo de 1200 pM. Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, p. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K<sup>26,34</sup> con bis-C12-diácido) tuvo una potencia in vitro correspondiente a un valor EC<sub>50</sub> de 1200 pM.

#### Ejemplo 45: Potencia in vitro (CRE luciferasa; células enteras)

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

Las potencias de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-42 se determinaron como se describe a continuación. Se incluyó la semaglutida para la comparación.

#### Principio

La potencia in vitro se determinó mediante la medición de la respuesta del receptor de GLP-1 humano en un ensayo de gen reportero. El ensayo se realizó en una línea celular BHK transfectada establemente que expresa el receptor de GLP-1 humano y contiene el ADN para el elemento de respuesta al AMPc (CRE) acoplado a un promotor y el gen para luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). Cuando el receptor de GLP-1 humano se activa esto da como resultado

la producción de AMPc, que a su vez da como resultado la expresión de la proteína luciferasa. Cuando se completó la incubación del ensayo, se añadió el sustrato de luciferasa (luciferina) y la enzima convirtió la luciferina a oxiluciferina y produjo bioluminiscencia. La luminiscencia se midió como la lectura para el ensayo.

- 5 Para probar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se realizó en ausencia de albúmina sérica así como también en presencia de una concentración considerablemente mayor de albúmina sérica (concentración final en el ensayo de 1,0 %). Un aumento de la potencia in vitro, valor de EC<sub>50</sub>, en presencia de albúmina sérica indica una afinidad a la albúmina sérica y representa un método para predecir un perfil farmacocinético prolongado de la sustancia de prueba en modelos animales.

10 Cultivo celular y preparación

15 Las células usadas en este ensayo (clon FCW467-12A/KZ10-1) fueron células BHK con BHKTS13 como una línea celular parental. Las células se derivaron de un clon (FCW467-12A) que expresa el receptor de GLP-1 humano y se estableció por transfección posterior con CRE luciferasa para obtener el clon actual.

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

Materiales

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

Tampones

30 El medio de cultivo celular consiste en FBS al 10 % (suero fetal bovino), 1 mg/ml G418, 240 nM MTX (metotrexato) y pen/estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 %. El medio de ensayo consistió en DMEM sin fenol rojo, 10 mM Hepes y 1x Glutamax. El tampón de ensayo al 1 % consistió en ovoalbúmina al 2 %, Pluronic F-68 al 0,2 % y HSA al 2 % en el medio de ensayo. El tampón de ensayo al 0 % consistió en ovoalbúmina al 2 % y Pluronic F-68 al 0,2 % en el medio de ensayo.

35 Procedimiento

- 1) Las reservas de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C.
- 40 2) Las células se lavaron tres veces en PBS.
- 3) Las células se contaron y se ajustaron a 5x10<sup>3</sup> células/50 µl (1x10<sup>5</sup> células/ml) en el medio de ensayo. Se transfirió una alícuota de 50 µl de células a cada pocillo en la placa de ensayo.
- 45 4) Las soluciones concentradas de los compuestos de prueba y de los compuestos de referencia se diluyeron hasta una concentración de 0,2 µM en tampón de ensayo al 0 % para el ensayo de CRE luciferasa con HSA al 0 % y tampón de ensayo al 1 % para el ensayo de CRE luciferasa con HSA. Los compuestos se diluyeron 10 veces para obtener las siguientes concentraciones: 2x10<sup>-7</sup> M, 2x10<sup>-8</sup> M; 2x10<sup>-9</sup> M, 2x10<sup>-10</sup> M, 2x10<sup>-11</sup> M, 2x10<sup>-12</sup> M y 2x10<sup>-13</sup> M. Para cada compuesto se incluyó, además, un control con un blanco del tampón de ensayo.
- 50 5) Se transfirió una alícuota de 50 µl del compuesto o blanco en triplicado de la placa de dilución a la placa de ensayo. Los compuestos se probaron en las siguientes concentraciones finales: 1x10<sup>-7</sup> M, 1x10<sup>-8</sup> M; 1x10<sup>-9</sup> M, 1x10<sup>-10</sup> M, 1x10<sup>-11</sup> M, 1x10<sup>-12</sup> M y 1x10<sup>-13</sup> M.
- 55 6) La placa de ensayo se incubó durante 3 h en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C.
- 7) La placa de ensayo se retiró de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min.
- 8) Se añadió una alícuota de 100 µl de reactivo steadylite plus a cada pocillo de la placa de ensayo (el reactivo era sensible a la luz).
- 60 9) Cada placa de ensayo se cubrió con papel de aluminio para protegerla de la luz y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente.
- 65 10) Cada placa de ensayo se leyó en un instrumento Packard TopCount NXT.

Cálculos y resultados

Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático promedia los valores para cada réplica y realiza una regresión no lineal. Los valores de EC<sub>50</sub> se calcularon mediante el programa informático y se muestran en la Tabla 2 a continuación (en pM).

Tabla 2: Potencia in vitro (CRE luciferasa)

Compuesto de Ejemplo núm.	EC <sub>50</sub> /pM (HSA al 0 %)	EC <sub>50</sub> /pM (HSA al 1 %)	EC <sub>50</sub> /pM (relación HSA al 1 % / HSA al 0 %)
1	4,0	57	15
2	6,2	59	9,5
3	7,8	80	10,3
4	6,8	1615	307
5	5,4	33	6,0
6	3,3	4570	1508
7	5,8	96	16
8	2,6	45	24
9	8,7	633	72
10	8,0	3630	456
11	7,3	1570	217
12	5,5	1147	194
13	2,2	1384	659
14	4,8	76	16
15	3,7	327	93
16	3,3	47	14
17	3,3	206	62
18	12	79	6,9
19	25	51	2,5
20	4,9	63	13
21	3,6	141	39
22	5,5	70	13
23	4,6	156	34
24	5,0	126	37
25	9,4	124	19
26	5,9	231	39
27	22	6190	276
28	17	5730	329
29	7,9	427	54
30	5,4	93	17
31	7,2	550	82
32	11	162	14
33	7,4	69	11
34	7,9	59	9,1
35	5,5	108	20
36	4,9	65	14
37	6,3	93	15
38	7,6	189	26
39	3,7	140	38
40	2,6	213	84
41	1,5	391	260
42	1,4	354	251

Todos los derivados tuvieron una buena potencia in vitro correspondiente a un EC<sub>50</sub> en HSA al 0 % por debajo de 200 pM.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, p. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K<sup>26,34</sup> con bis-C12-diácido) tuvo una potencia in vitro correspondiente a un EC<sub>50</sub> en HSA al 0 % de 440 pM, un EC<sub>50</sub> en HSA al 1 % de 3317 pM, y una relación (HSA al 1 %/ HSA al 0 %) de 7,5.

Ejemplo 46: Unión al receptor de GLP-1



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

5 La afinidad de unión de los derivados de GLP-1 de los Ejemplos 1-43 al receptor de GLP-1 humano se midió por medio de su capacidad para desplazar <sup>125</sup>I-GLP-1 del receptor. Para probar la unión de los derivados a la albúmina, el ensayo se realizó con una baja concentración de albúmina (0,001 % - correspondiente a la cantidad residual de la misma en el trazador), así como también con una alta concentración de albúmina (2,0 % añadida). Un cambio en la afinidad de unión, IC<sub>50</sub>, es una indicación de que el péptido en cuestión se une a albúmina y por lo tanto una predicción de un posible perfil farmacocinético prolongado del péptido en cuestión en modelos animales.

Condiciones

15 Especies (in vitro): Hámster

Punto Final Biológico: Unión al Receptor

Método de Ensayo: SPA

20 Receptor: receptor de GLP-1

Línea Celular: BHK tk-ts13

Cultivo de células y purificación de membrana

25 Una línea celular transfectada estable y un clon de alta expresión se seleccionaron para tamizaje. Las células se cultivaron en CO<sub>2</sub> al 5 % en DMEM, FCS al 10 %, Pen/Strep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418.

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

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

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

Ensayo de unión:

45 SPA:

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

Tampón de ensayo:

60 50 mM HEPES

5 mM EGTA

5 mM MgCl<sub>2</sub>

65 Tween 20 al 0,005 %

pH 7,4

HSA fue SIGMA A1653

5 Cálculos

El valor de IC<sub>50</sub> se leyó de la curva como la concentración que desplaza el 50 % de <sup>125</sup>I-GLP-1 del receptor.

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

15 El valor de IC<sub>50</sub> a concentración alta de albúmina es una medida de la influencia de la albúmina en la unión del derivado al receptor de GLP-1. Como se conoce, los derivados de GLP-1 también se unen a la albúmina. Este es un efecto generalmente deseable, el que extiende su tiempo de vida media en plasma. Por lo tanto, el valor de IC<sub>50</sub> a albúmina alta será mayor generalmente que el valor de IC<sub>50</sub> a albúmina baja, lo que corresponde a una unión reducida al receptor de GLP-1, provocada por la unión a la albúmina que compite con la unión al receptor de GLP-1.

Resultados

20 Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3: Afinidad de unión al receptor

Compuesto de Ejemplo núm.	IC <sub>50</sub> /nM (HSA baja)	IC <sub>50</sub> /nM (HSA alta)
1	0,22	13
2	0,24	29
3	0,93	71
4	0,48	172
5	1,03	64
6	0,32	≥1000
7	0,13	106
8	0,68	269
9	0,64	321
10	0,84	490
11	0,74	522
12	0,33	222
13	0,76	545
14	0,30	154
15	0,35	303
16	0,24	199
17	0,42	632
18	0,99	159
19	0,77	147
20	0,13	48
21	0,22	484
22	0,26	251
23	0,27	102
24	0,27	136
25	0,18	274
26	0,38	106
27	0,25	689
28	1,67	≥1000
29	0,55	56
30	0,42	203
31	0,76	40
32	1,57	27
33	0,31	33
34	0,12	45
35	0,08	36
36	0,10	25
37	0,11	24
38	0,21	53

65

Compuesto de Ejemplo núm.	IC <sub>50</sub> /nM (HSA baja)	IC <sub>50</sub> /nM (HSA alta)
39	0,06	131
40	0,03	195
41	0,03	641
42	0,02	123

Todos los derivados tuvieron una IC<sub>50</sub> (albúmina baja) por debajo de 2,0 nM. Con respecto a la IC<sub>50</sub> (albúmina alta), con dos excepciones todos los derivados tuvieron una IC<sub>50</sub> (albúmina alta) por debajo de 1000 nM.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, p. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K<sup>26,34</sup> con bis-C12-diácido) tuvo una relación de IC<sub>50</sub> (albúmina baja) de 17,7 nM, y una IC<sub>50</sub> (albúmina alta) de 908 nM.

#### Ejemplo 47: Estudio farmacocinético (PK) en minicerdos

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

Los derivados de los Ejemplos 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 18, y 22 se sometieron al estudio de PK A (ver a continuación), mientras que los derivados de los Ejemplos 9, 16, 17, 19, 20, 24, 26, 29, y 36 se sometieron al estudio de PK B (ver a continuación).

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

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

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

**Estudio B:** En los estudios se usaron minicerdos de Göttingen machos obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmoose, Dinamarca), de aproximadamente 5 meses de edad y con un peso aproximado de 9 kg. Los minicerdos se alojaron en corrales con lecho de paja, seis juntos en cada corral y se alimentaron de manera restringida una o dos veces al día con dieta para minicerdos Altromin 9023 (Chr. Petersen A/S, DK-4100 Ringsted) o dieta para minicerdos Standard SMP(E) (Special Diet Services (SDS), UK). Los cerdos se usaron para los estudios farmacocinéticos repetidos con un período de reposo farmacológico adecuado entre las dosificaciones sucesivas de los derivados de GLP-1. Se permitió un período de aclimatación de 1 a 4 semanas, durante el cual los minicerdos se entrenaron para que se apoyaran sobre la espalda para la extracción de muestras de sangre y en las eslingas para la administración i.v de las dosis. Toda la manipulación, administración de la dosis y extracción de muestras de sangre de los animales se realizó por personal capacitado y experto.

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

Los derivados de GLP-1 se disolvieron en 50 mM fosfato de sodio, 145 mM cloruro de sodio, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración generalmente de 20-60 nmol/ml. Las inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a usualmente 2 nmol/kg, por ejemplo, 0,1 ml/kg) de los compuestos se administraron como inyecciones intravenosas a través de un catéter intravenoso periférico insertado en una vena de la oreja, mientras los animales se colocaron sin anestesia en una eslinga. El volumen de dosis fue de 0,1 ml/kg, y se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos por hasta 17 días después de la administración de la dosis (las muestras se tomaron con una jeringa de

una vena yugular). Las muestras de sangre (por ejemplo 0,8 ml) se recolectaron en tampón de EDTA (8 mM) y después se centrifugaron a 4 °C y 2000 G durante 10 minutos.

Muestreo y análisis (estudio A y B): El plasma se pipeteó en tubos Micronic sobre hielo seco y se mantuvo a -20 °C hasta que se analizó la concentración plasmática del compuesto de GLP-1 respectivo mediante el uso de ELISA o un ensayo basado en anticuerpo similar o LC-MS. Los perfiles individuales de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante un modelo no compartimental en Phoenix WinNonlin ver. 6.2. (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos), y se determinaron los tiempos de vida media terminales resultantes (media armónica).

Resultados

Se probaron un número de compuestos ilustrativos, y los resultados se muestran en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Vida media en minicerdos

Compuesto de Ejemplo núm.	PK en minicerdos, T <sub>1/2</sub> (horas)
6	98
7	69
9	72
10	97
11	95
12	109
13	93
14	88
16	64
17	71
18	47
19	56
20	59
22	59
24	123
26	13
29	82
36	69

Todos los compuestos probados tuvieron un tiempo de vida media superior a 5 horas, y la mayoría de los compuestos tuvieron una vida media muy fina por encima de 50 horas.

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

Ejemplo 48: Estudio farmacocinético (PK) en rata

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

Los estudios farmacocinéticos in vivo en ratas se realizaron con los derivados de GLP-1 de un número de compuestos ilustrativos como se describe a continuación. Se incluyó la semaglutida para la comparación.

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

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

Las concentraciones plasmáticas de los compuestos de GLP-1 se determinaron mediante el uso de un Inmunoensayo de Canalización de Oxígeno de Luminiscencia (LOCI), generalmente como se describe para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-247. Las perlas donantes se recubrieron con estreptavidina, mientras que las perlasceptoras se conjugaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo medio/C-terminal del péptido. Otro anticuerpo monoclonal, específico para el N-terminal, se biotiniló. Los tres reactivos se combinaron con el analito y formaron un inmunocomplejo de dos sitios. La iluminación

del complejo liberó átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes, que se canalizaron en las esferasceptoras y desencadenaron la quimioluminiscencia que se midió en un lector de placas Envision. La cantidad de luz fue proporcional a la concentración del compuesto.

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

#### Resultados

10

Los resultados se muestran en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5: Vida media en rata

Compuesto de Ejemplo núm.	PK en rata, $T_{1/2}$ (horas)
1	14
2	17
4	17
6	25
7	17
8	14
9	20
10	28
11	28
12	28
13	31
14	19
15	20
16	17
17	24
18	20
19	13
20	14
22	15
23	19
26	16
27	21
29	19
30	16

40

Todos los compuestos probados tuvieron una vida media de al menos 13 horas. La vida media de la semaglutida analizada en las mismas condiciones pero con n=8 fue de 11 horas.

#### 45 Ejemplo 49: Estudio farmacodinámico (PD) en cerdos

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

50

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

60

Los derivados de GLP-1 se disolvieron en un tampón fosfato (50 mM fosfato de sodio, 145 mM cloruro de sodio, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4) a concentraciones de 12, 40, 120, 400 o 1200 nmol/ml correspondiente a dosis de 0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg. El tampón fosfato sirve como vehículo. Los animales se dosificaron con una sola dosis subcutánea del derivado de GLP-1 o vehículo (volumen de dosis de 0,025 ml/kg) en la mañana del día 1 y la ingesta de alimentos se midió durante 1 día después de la dosificación. El último día de cada estudio, 1-4 días después de la dosificación, se tomó una muestra de sangre para medir la exposición en plasma del derivado de GLP-1 del corazón en animales

65

anestesiados. A continuación, los animales se sacrificaron con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital. El contenido en plasma de los derivados de GLP-1 se analizó mediante el uso de ELISA o un ensayo basado en anticuerpos similar o LC-MS.

5 La ingesta de alimentos se calcula como media  $\pm$  SEM de ingesta de comida en intervalos de 24 horas (0-24 h, 24-48 h, y 48-72 h). En la Tabla 6 a continuación se indica la ingesta de alimentos como el porcentaje de la ingesta de alimentos del grupo vehículo en el mismo intervalo de tiempo (dosificación 3,0 nmol/kg).

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

### Resultados

15 Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Efecto sobre la ingesta de alimentos en cerdos

Compuesto de Ejemplo núm./Intervalo de tiempo (h)	PD en cerdo, ingesta de alimentos (% de vehículo) por horas (x-y)		
	0-24	24-48	48-72
20 6	84	85	73
7	14	18	
10	105	104	
16	33	43	
25 19	52	64	
24	73	73	
26	10	26	52

30 Todos, excepto uno de estos compuestos mostraron una reducción muy buena en la ingesta de alimentos. Esto es en particular para el compuesto de los Ejemplos 7 y 26.

Para comparación, el compuesto núm. 13 en la Tabla 1 de Journal of Medicinal Chemistry (2000), vol. 43, núm. 9, p. 1664-669 (GLP-1(7-37) acilado en K<sup>26,34</sup> con bis-C12-diácido) cuando se probó de la misma forma tuvo una ingesta de alimentos (% de vehículo) por horas 0-24, 24-48, y 48-72, de 95 %, 96 %, y 103 %, respectivamente.

35 Ejemplo 50: Ejemplo comparativo - potencia in vitro y unión al receptor de GLP-1

40 El propósito de este ejemplo es comparar la potencia in vitro y la unión al receptor de GLP-1 de aquellos derivados de GLP-1 de la invención para los que un compuesto comparador directo que difiere solamente en la parte del conector del derivado se encuentra en la técnica anterior.

Los compuestos comparadores directos se describen en el documento WO2011/080103.

45 La Tabla 7 a continuación muestra los ejemplos de los compuestos en cuestión, así como su estructura en trazos, y la Tabla 8 muestra sus datos de potencia in vitro y de unión al receptor de GLP-1, determinados como se describe en los Ejemplos 44, 45, y 46 en la presente descripción.

50 Las abreviaturas usadas en la Tabla 7 para caracterizar las porciones de prolongación y conectores se definen de la siguiente manera: El diácido C16 se refiere al Quím. 1 con x=14; el diácido C14 se refiere al Quím. 1 con x=12; 4-COOH-PhO-C10 se refiere al Quím. 2 con y=9; gGlu se refiere al Quím. 14; eps-Lys se refiere al Quím. 3 con w=0 y q=4 (Quím. 6); y OEG se refiere al Quím. 12 con k=n=1 (Quím. 13).

55 Hay cuatro conjuntos de derivados de la invención frente a su compuesto comparador directo conocido del documento WO2011/080103, y estos conjuntos se separan por líneas dobles en las Tablas 7 y 8 a continuación.

Tabla 7: Estructura de los compuestos y los compuestos comparativos

Derivado de la invención	Compuesto comparativo (documento WO 2011/080103)	Cambios de aminoácidos (rel. a SEQ ID NO: 1)	Posiciones de acilación	Porción de prolongación	Conector
60 Ejemplo 6		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	gGlu-2xeps-Lys
Ejemplo 10		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	gGlu-2xOEG-eps-Lys
65 Ejemplo 11		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	2xgGlu-OEG-eps-Lys

Derivado de la invención	Compuesto comparativo (documento WO 2011/080103)	Cambios de aminoácidos (rel. a SEQ ID NO: 1)	Posiciones de acilación	Porción de prolongación	Conector
Ejemplo 12		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	2xgGlu-2xeps-Lys
Ejemplo 13		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	3xgGlu-eps-Lys
	Ejemplo 3	8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C16	gGlu-2xOEG
Ejemplo 2		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C14	gGlu-2xeps-Lys
Ejemplo 19		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C14	gGlu-2xOEG-eps-Lys
	Ejemplo 4	8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	Diácido C14	gGlu-2xOEG
Ejemplo 1		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	4-COOH-PhO-C10	gGlu-2xeps-Lys
Ejemplo 5		8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	4-COOH-PhO-C10	gGlu-2xOEG-eps-Lys
	Ejemplo 2	8Aib, 34R, 37K	26K, 37K	4-COOH-PhO-C10	gGlu-2xOEG
Ejemplo 32		8Aib, 31H, 34Q, 37K	26K, 37K	4-COOH-PhO-C10	gGlu-2xeps-Lys
	Ejemplo 17	8Aib, 31H, 34Q, 37K	26K, 37K	4-COOH-PhO-C10	gGlu-2xOEG

Tabla 8: Comparación de la potencia in vitro y los datos de unión al receptor de GLP-1

Derivado de la invención	Compuesto comparativo del documento WO 2011/080103	Potencia in vitro (Ejemplo 44) EC50/pM	Potencia in vitro (Ejemplo 45) (HSA al 0 %) EC50/pM	Potencia in vitro (Ejemplo 45) (HSA al 1 %) EC50/pM	Unión al receptor de GLP-1 (Ejemplo 46) (HSA baja) IC50/nM	Unión al receptor de GLP-1 (Ejemplo 46) (HSA alta) IC50/nM
Ejemplo 6		634	3,3	4570	0,32	≥1000
Ejemplo 10		492	8,0	3630	0,84	490
Ejemplo 11		426	7,3	1570	0,74	522
Ejemplo 12		227	5,5	1147	0,33	222
Ejemplo 13		385	2,2	1384	0,76	545
	Ejemplo 3	1683	41	4910	3,55	751
Ejemplo 2		44	6,2	59	0,24	29
Ejemplo 19		57	25	51	0,77	147
	Ejemplo 4	366	46	92	6,02	357
Ejemplo 1		59	4,0	57	0,22	13
Ejemplo 5		33	5,4	33	1,03	64
	Ejemplo 2	112	6,7	221	2,27	485
Ejemplo 32		-	11	162	1,57	27
	Ejemplo 17	582	132	356	45	≥1000

Los resultados en la Tabla 8 muestran que los derivados de la invención son mucho más potentes y se unen mucho mejor al receptor de GLP-1 en comparación con su respectivo compuesto comparador directo conocido del documento WO2011/080103 que difiere solamente en el conector.

Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados de GLP-1 doble-acilados

<130> 8503.204-WO

ES 2 770 599 T3

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> mat\_péptido  
<222> (1)..(31)

<400> 1

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

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

20



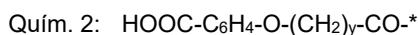
## REIVINDICACIONES

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

5 cuyo análogo comprende un primer residuo de K en una posición correspondiente a la posición 26 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), un segundo residuo de K en una posición correspondiente a la posición 37 de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1), y un máximo de ocho cambios de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-37),

10 cuyo derivado comprende dos porciones de prolongación unidas a dicho primer y segundo residuo de K, respectivamente, mediante un conector, en donde

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

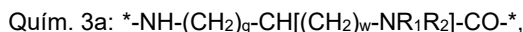


15



en donde x es un número entero en el intervalo de 8-16 y "y" es un número entero en el intervalo de 6-13; y

20 el conector comprende el



25 que se conecta en su extremo CO-\* al grupo épsilon amino del primer o segundo residuo de K del análogo de GLP-1, y en donde q es un número entero en el intervalo de 0-5, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente \*-H o \*-CH<sub>3</sub>, y w es un número entero en el intervalo de 0-5;

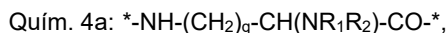
cuyo derivado tiene una potencia correspondiente a una EC<sub>50</sub> en HSA al 0 % por debajo de 400 pM;

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

2. El derivado de la reivindicación 1, en donde w es 0.

3. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el Quím. 3a se representa por el

35

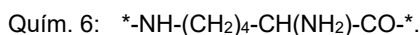


en donde q es un número entero en el intervalo de 3-5.

40 4. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde q es 4.

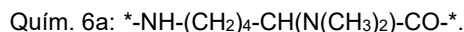
5. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el Quím. 3a, o el Quím. 4a, respectivamente, se representan por el

45



6. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el Quím. 3a, o el Quím. 4a, respectivamente, se representan por el

50



7. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la porción de prolongación es el Quím. 1, y x es 12, 14, o 16.

55 8. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la porción de prolongación es el Quím. 2, y "y" es 9, 10 u 11.

9. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el análogo tiene un máximo de seis cambios de aminoácidos.

60

10. El derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el análogo es un péptido de la Fórmula I:

Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Xaa<sub>18</sub>-Xaa<sub>19</sub>-Xaa<sub>20</sub>-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Xaa<sub>25</sub>-Lys-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-Xaa<sub>30</sub>-Xaa<sub>31</sub>-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-Lys-Xaa<sub>38</sub>, en donde

65

Xaa<sub>7</sub> es L-histidina, imidazopropionilo, α-hidroxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N<sup>α</sup>-acetil-histidina, N<sup>α</sup>-formil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina, o 4-piridilalanina;

5 Xaa<sub>8</sub> es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

10 Xaa<sub>12</sub> es Phe o Leu;

Xaa<sub>16</sub> es Val o Leu;

Xaa<sub>18</sub> es Ser, Val, o Leu;

15 Xaa<sub>19</sub> es Tyr o Gln;

Xaa<sub>20</sub> es Leu o Met;

20 Xaa<sub>22</sub> es Gly, Glu, o Aib;

Xaa<sub>23</sub> es Gln, Glu o Arg;

Xaa<sub>25</sub> es Ala o Val;

25 Xaa<sub>27</sub> es Glu o Leu;

Xaa<sub>30</sub> es Ala, Glu o Arg;

30 Xaa<sub>31</sub> es Trp o His;

Xaa<sub>33</sub> es Val;

Xaa<sub>34</sub> es Glu, Asn, Gly, Gln, Arg, o His;

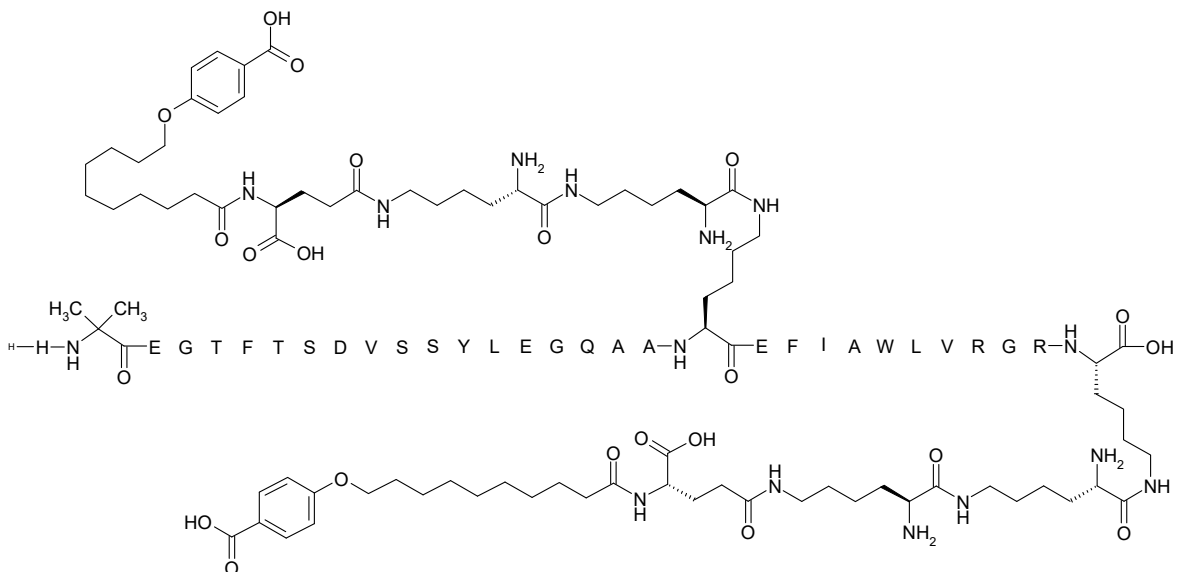
35 Xaa<sub>35</sub> es Gly o Aib;

Xaa<sub>36</sub> es Arg o Gly; y

40 Xaa<sub>38</sub> es Ser, Gly, Ala, Glu, Pro, Arg, o ausente.

11. Un compuesto que se selecciona de los siguientes:

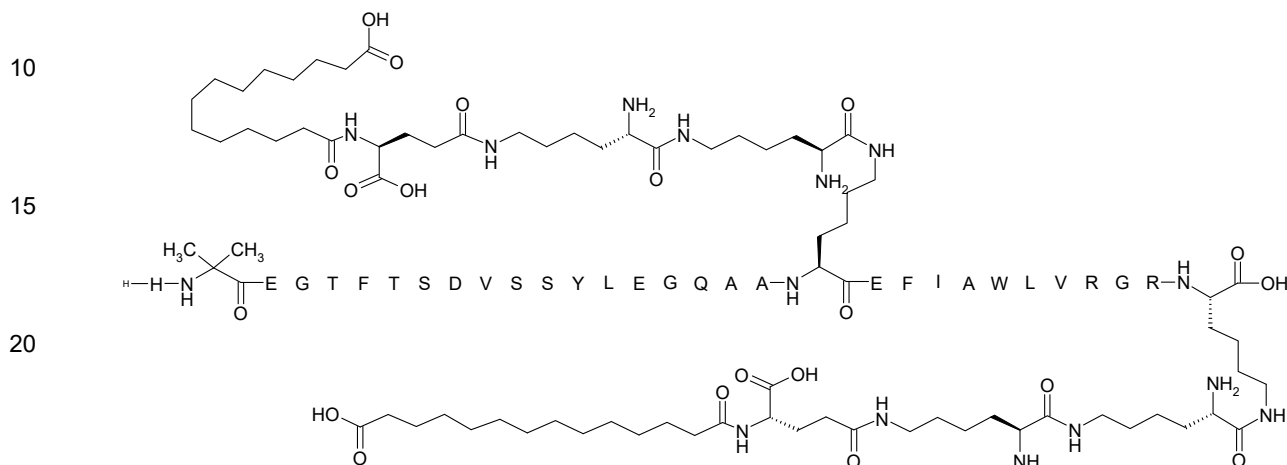
Quím. 21:



N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

5

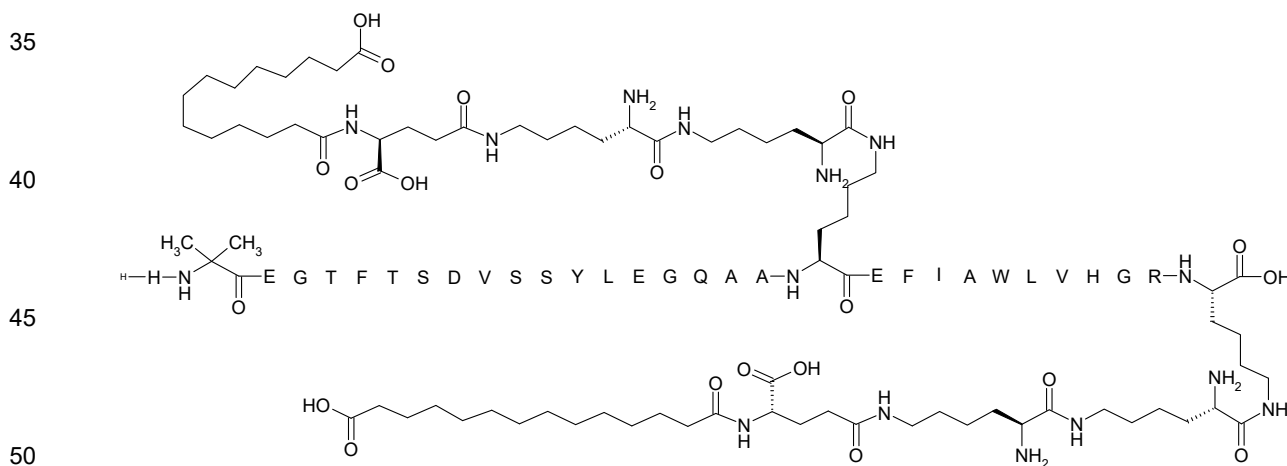
Quím. 22:



N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

30

Quím. 23:



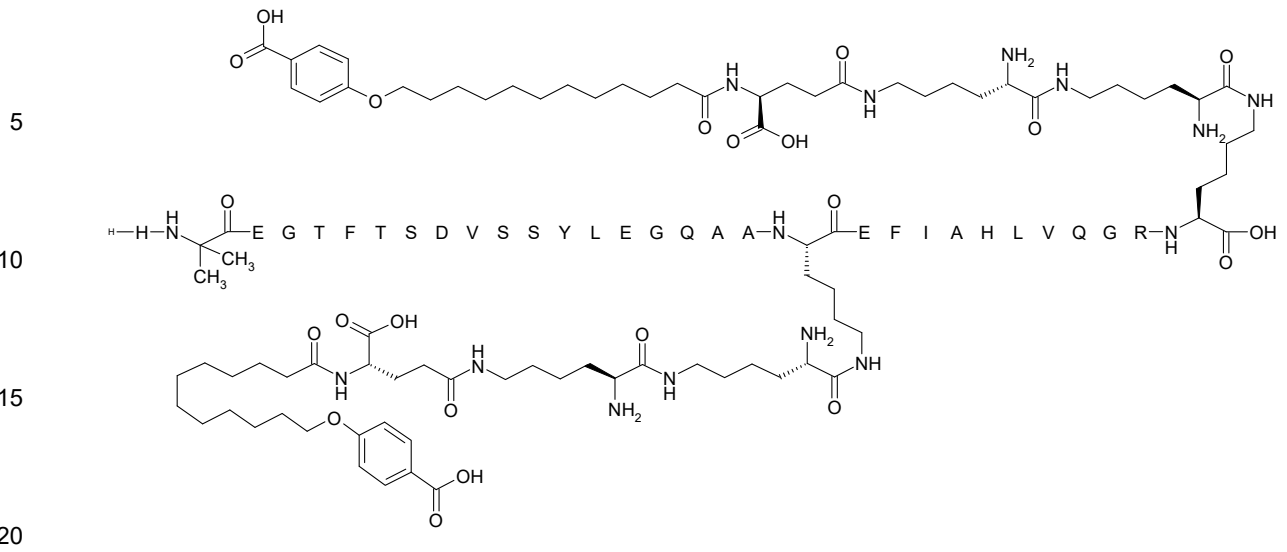
N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

55

Quím. 24:

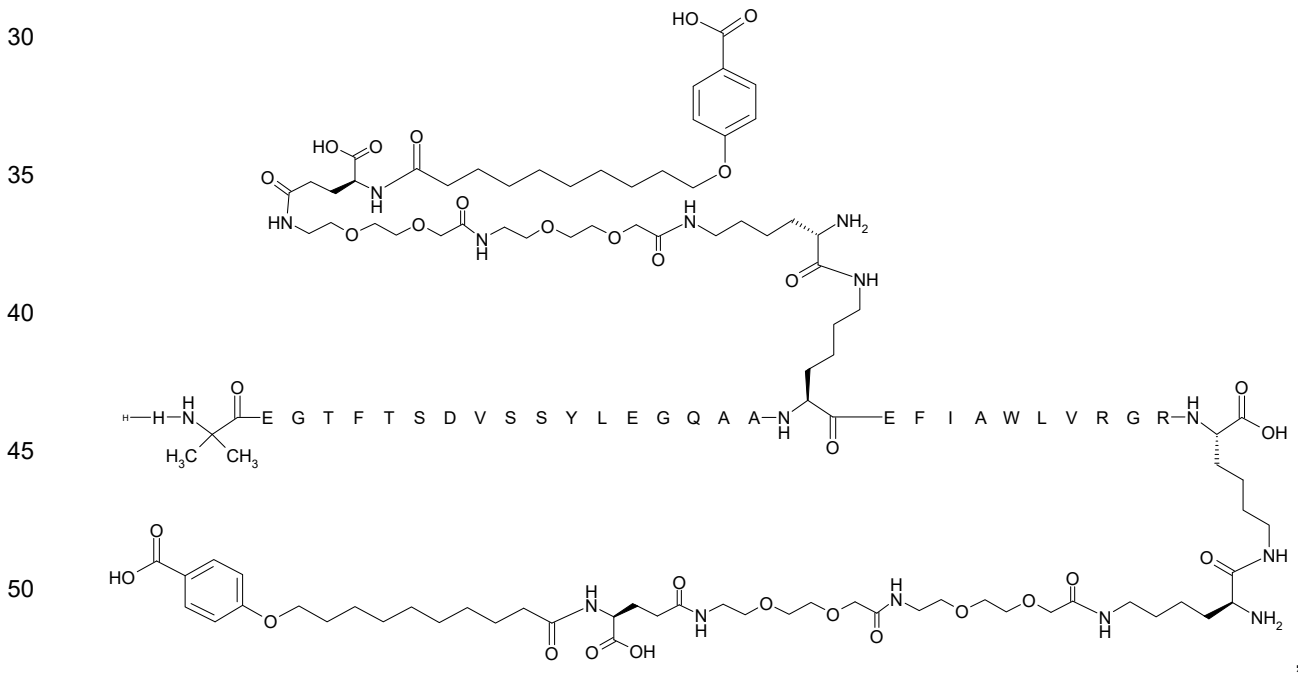
60

65



25  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>31</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 25:

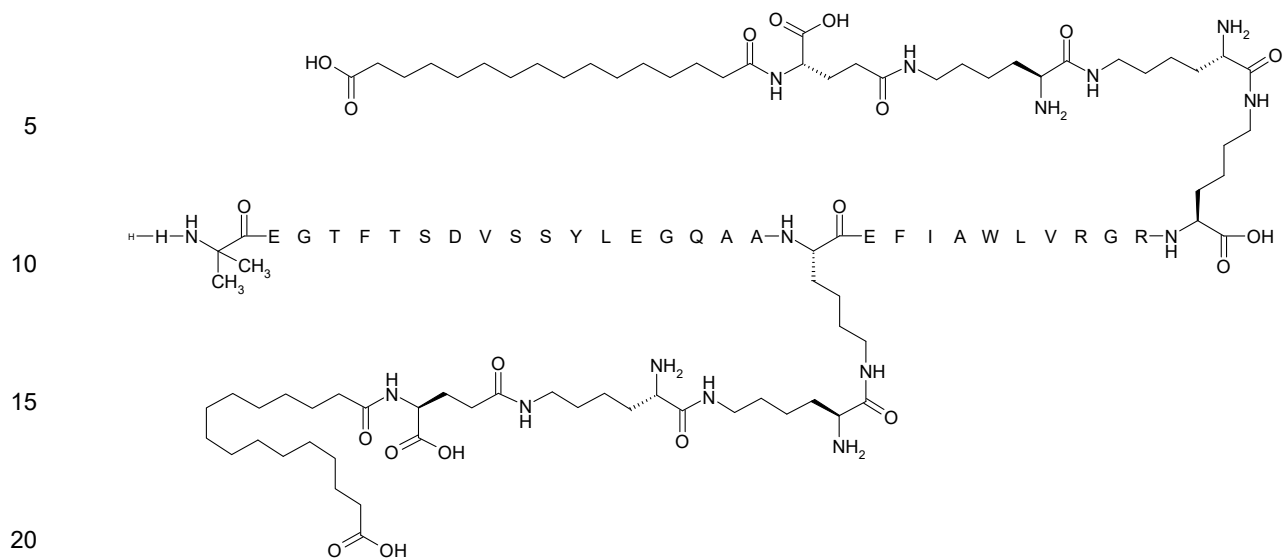


55  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-7-37)-péptido,

60

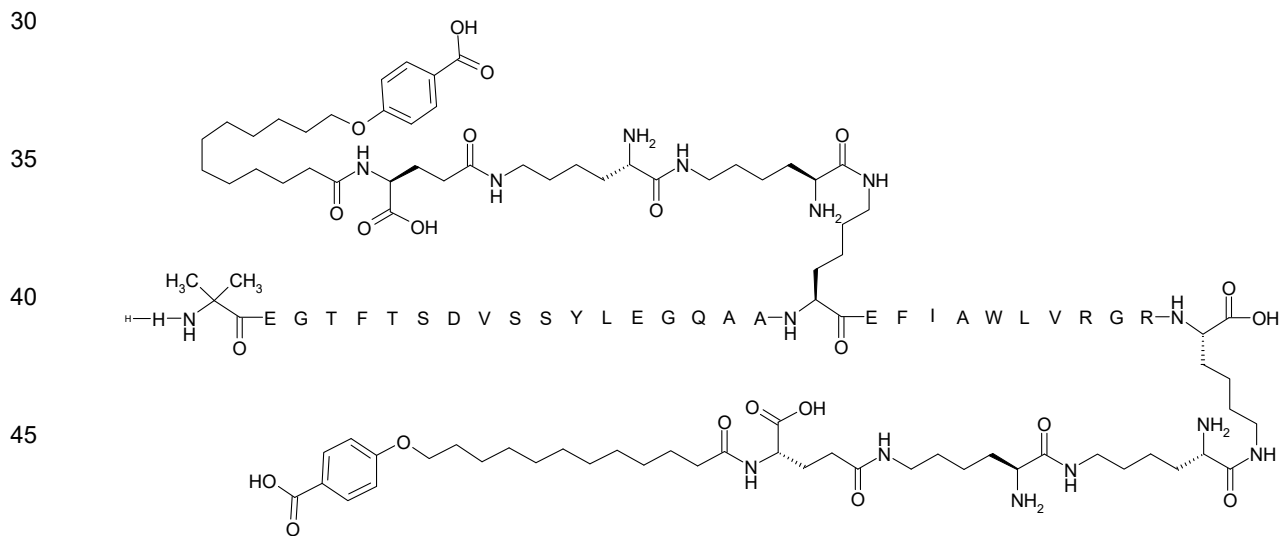
Quím. 26:

65



25  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

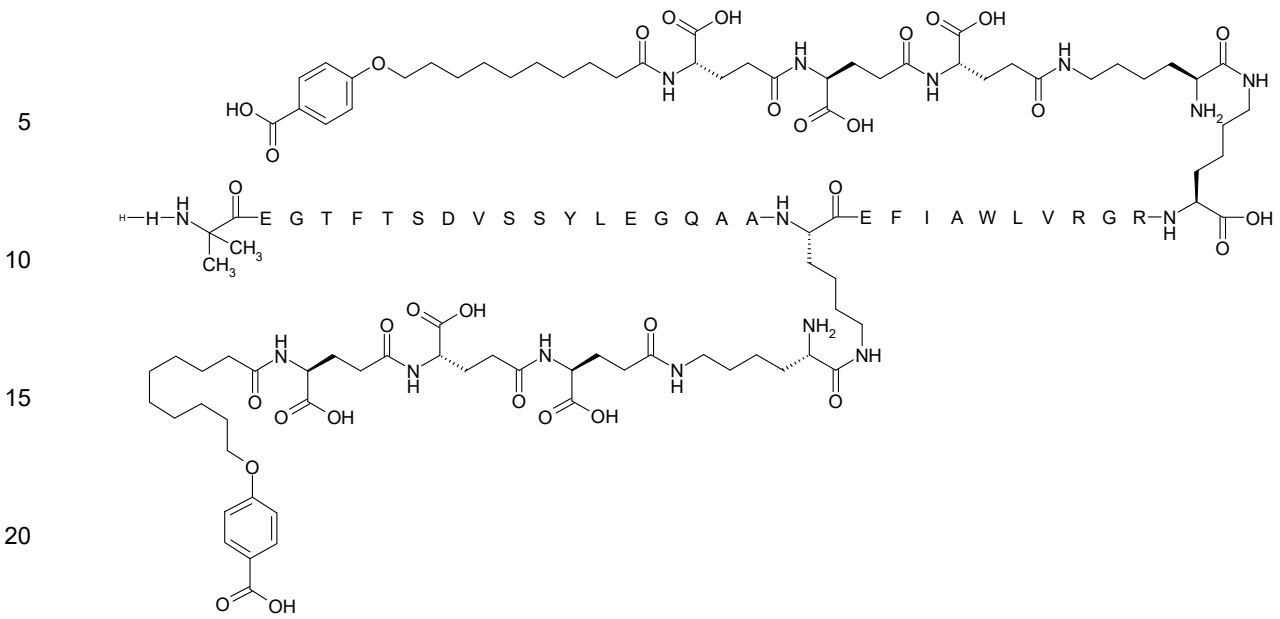
Quím. 27:



50  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 28:

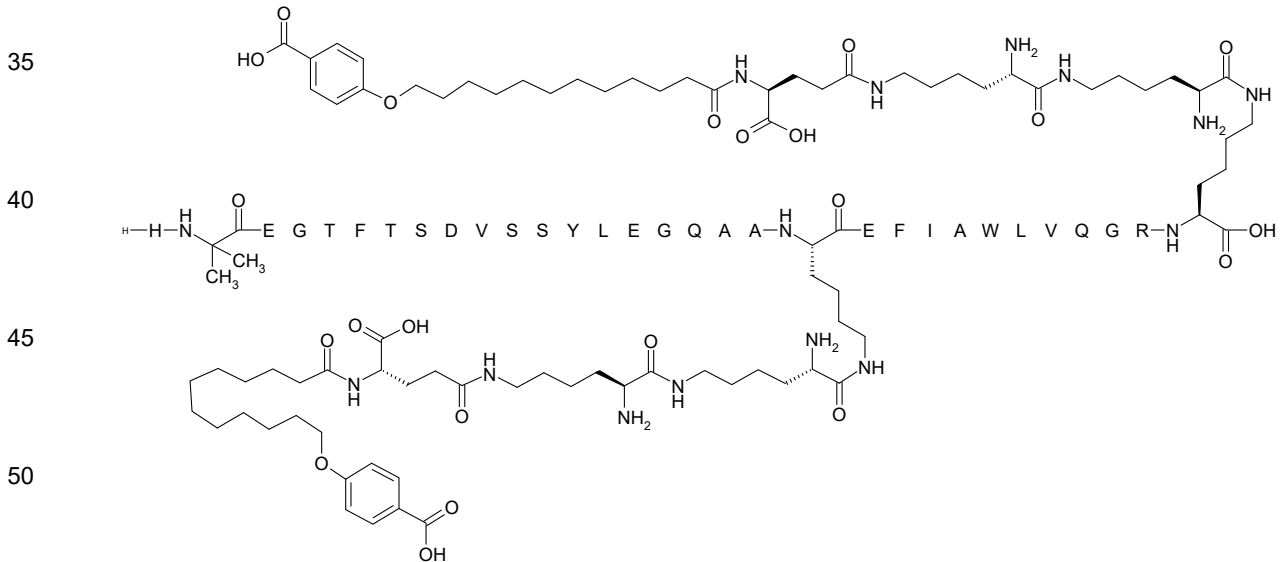
60  
65



25  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

30

Quím. 29:



55  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

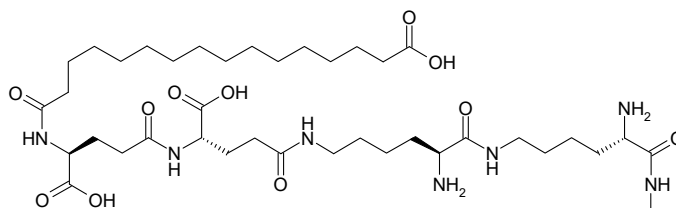
60

Quím. 30:

65



5

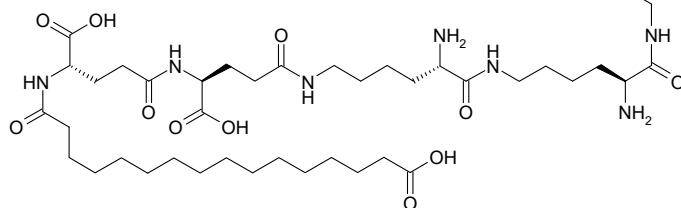


10



15

20



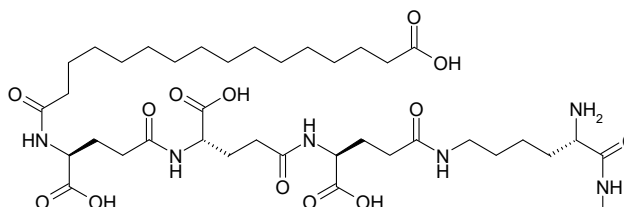
25

$N^{\varepsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\varepsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

30

Quím. 33:

35

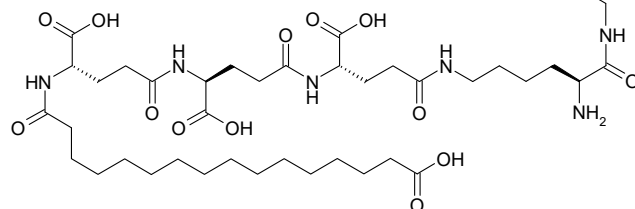


40

45



50



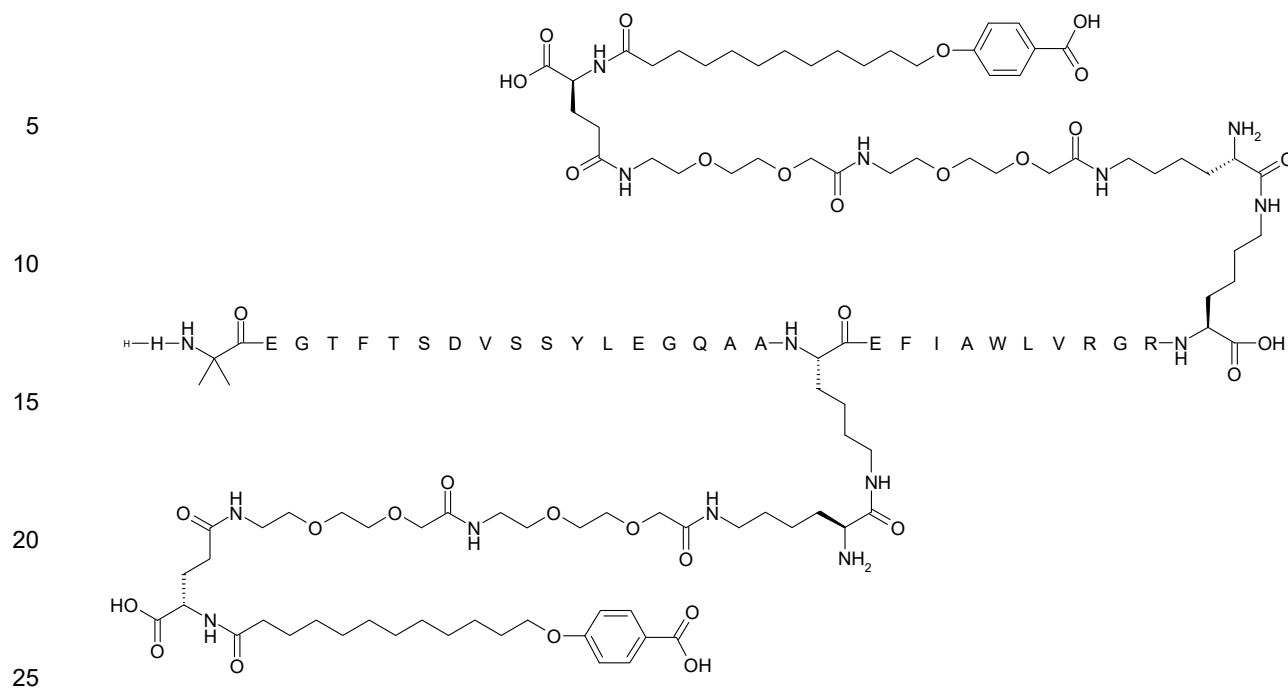
55

$N^{\varepsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil],  $N^{\varepsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

65

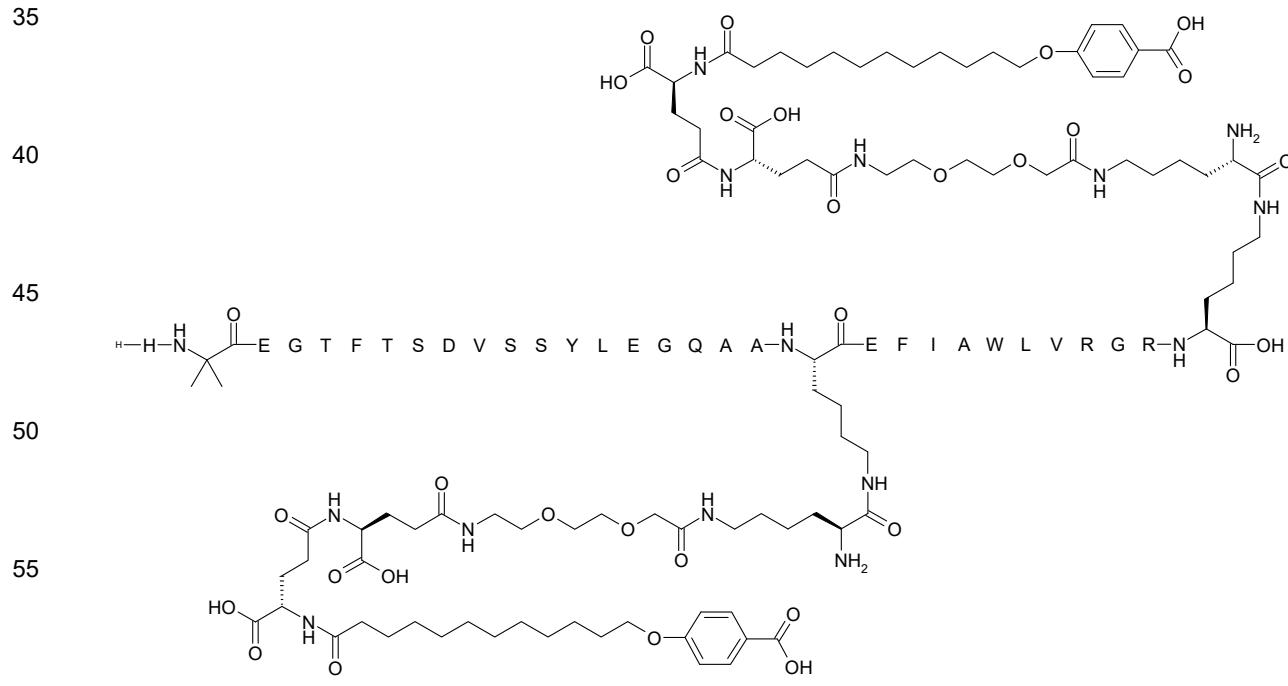
Quím. 34:





30 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 35:



65 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[12-(4-carboxifenoxy)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

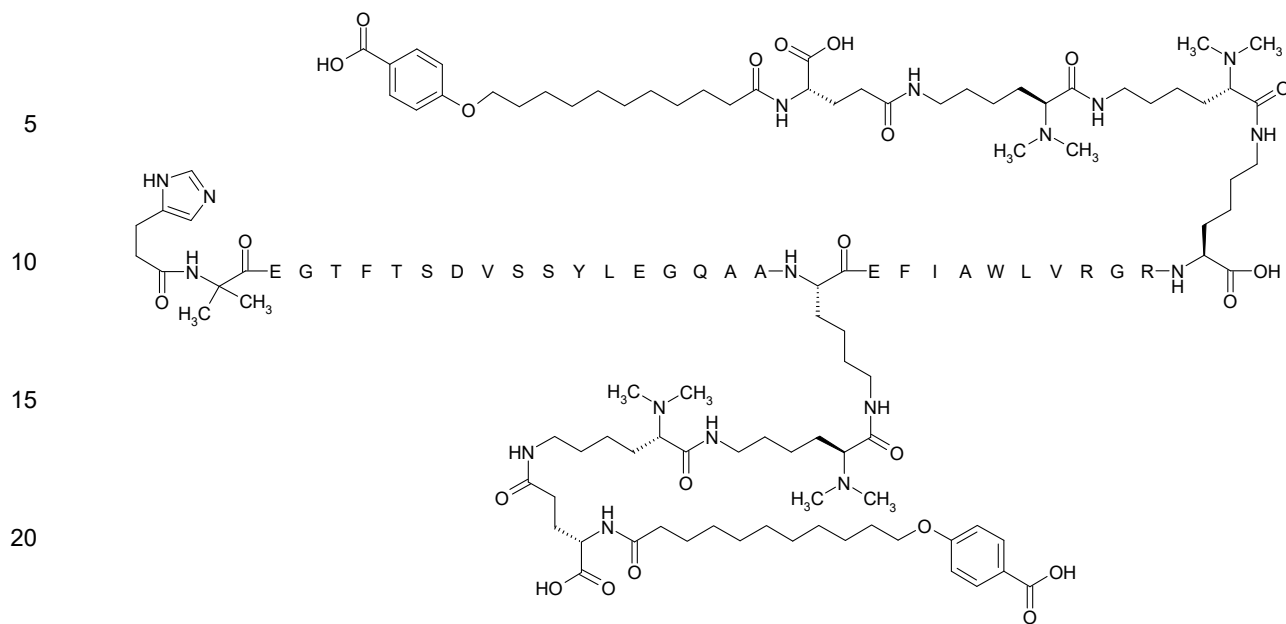






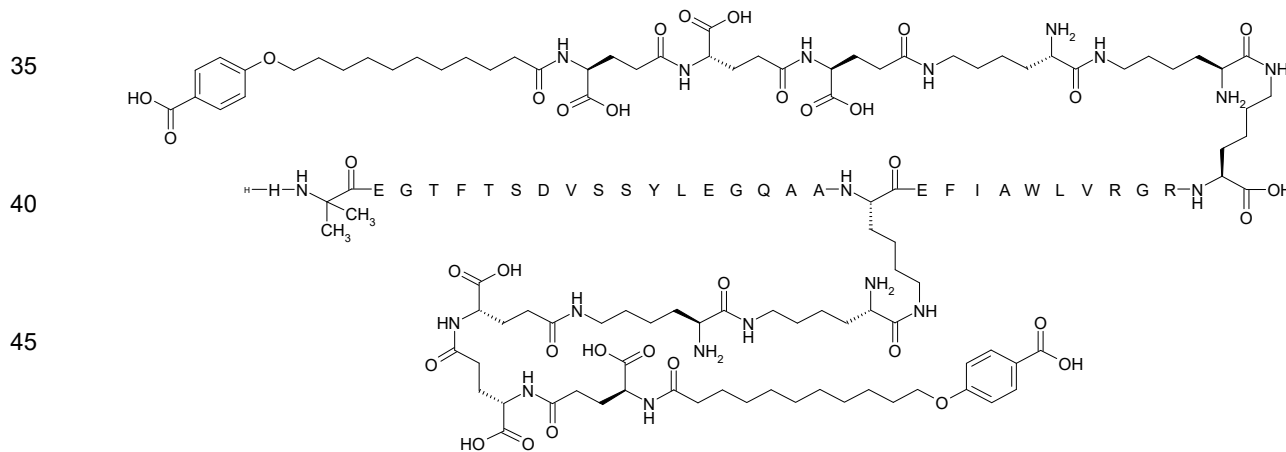






$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]-[Imp<sup>7</sup>,Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 50:



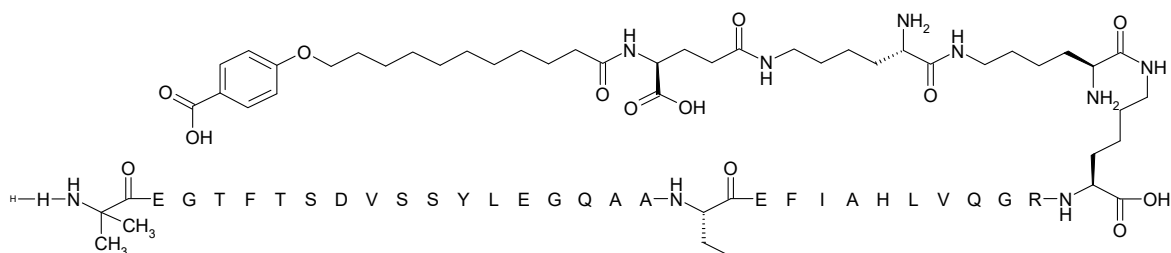
$N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 51:

60

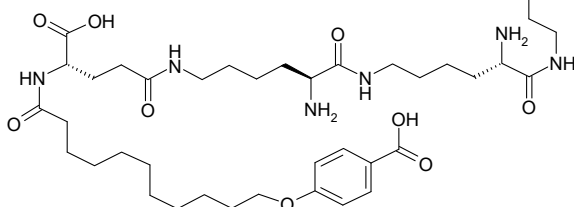
65

5



10

15



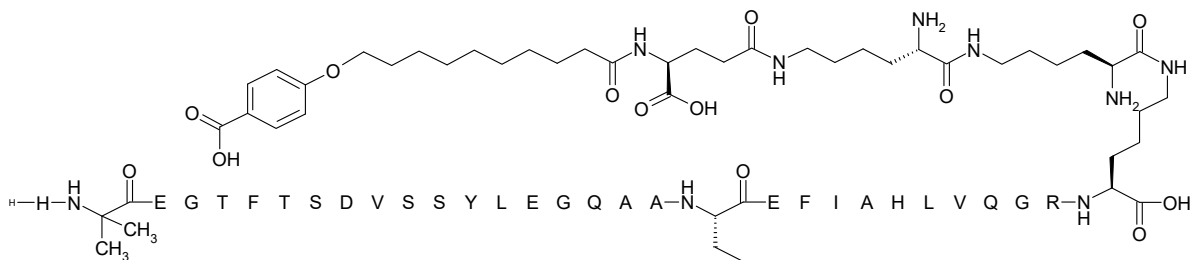
20

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>31</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

25

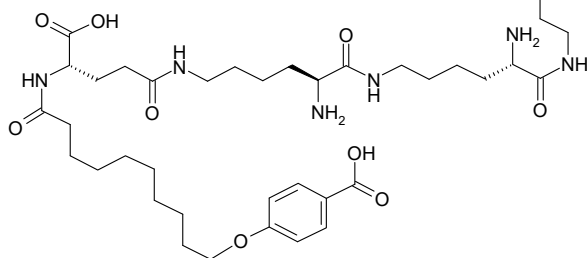
Quím. 52:

30



35

40



45

N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,His<sup>31</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

55

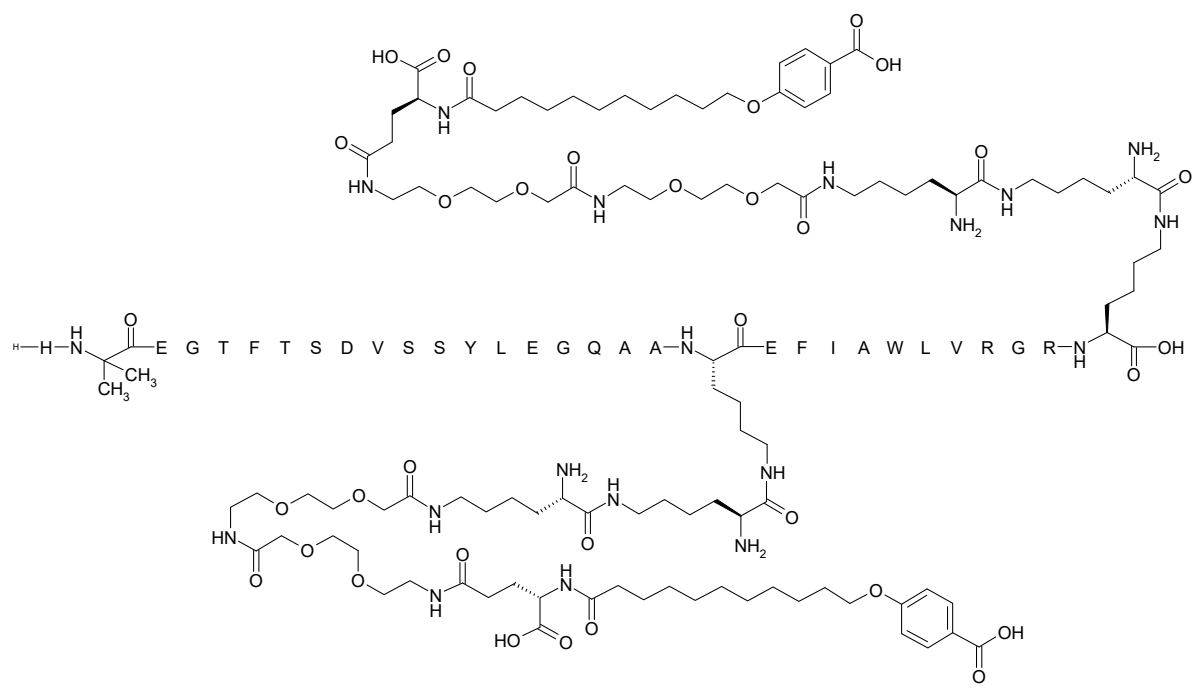
Quím. 53:

60

65

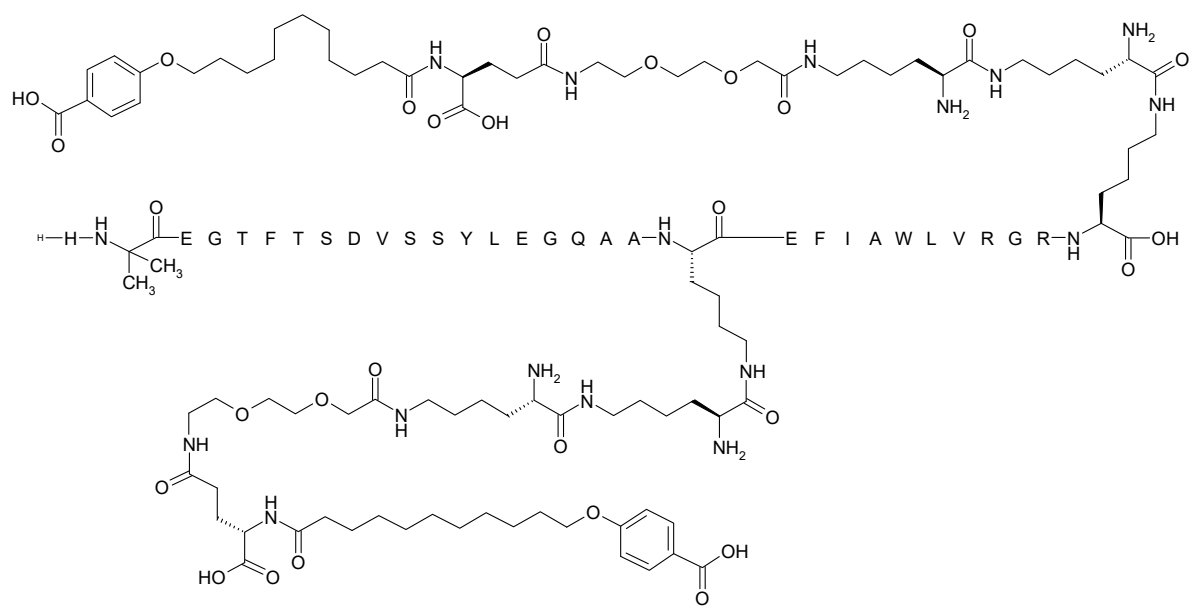


5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



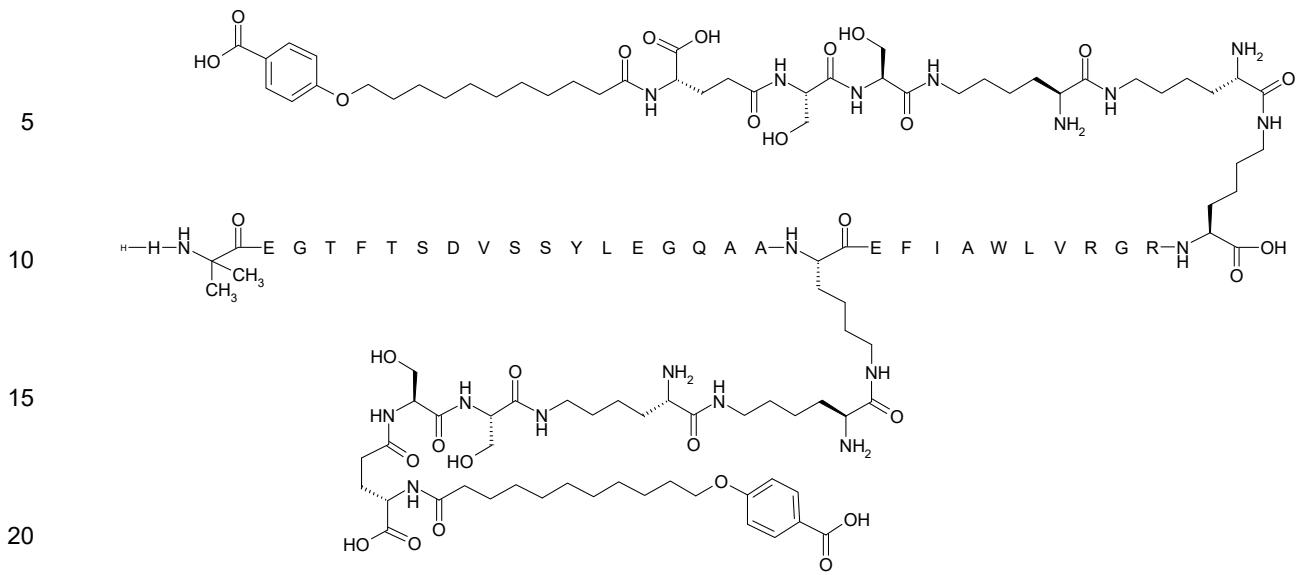
N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-[11-(4-carboxyphenoxy)undecanoylamino]butanoyl]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoyl]amino]hexanoyl], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-[11-(4-carboxyphenoxy)undecanoylamino]butanoyl]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoyl]amino]hexanoyl]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 54:



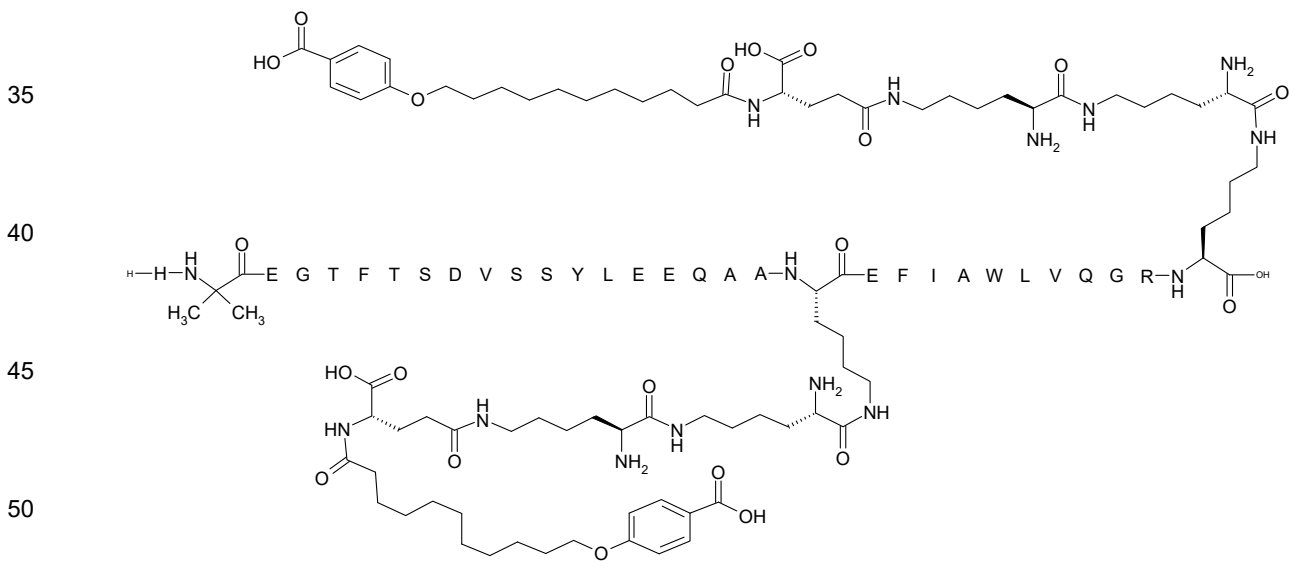
N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-[11-(4-carboxyphenoxy)undecanoylamino]butanoyl]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoyl]amino]hexanoyl], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxy-4-[11-(4-carboxyphenoxy)undecanoylamino]butanoyl]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoyl]amino]hexanoyl]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 55:



25  $N^{26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

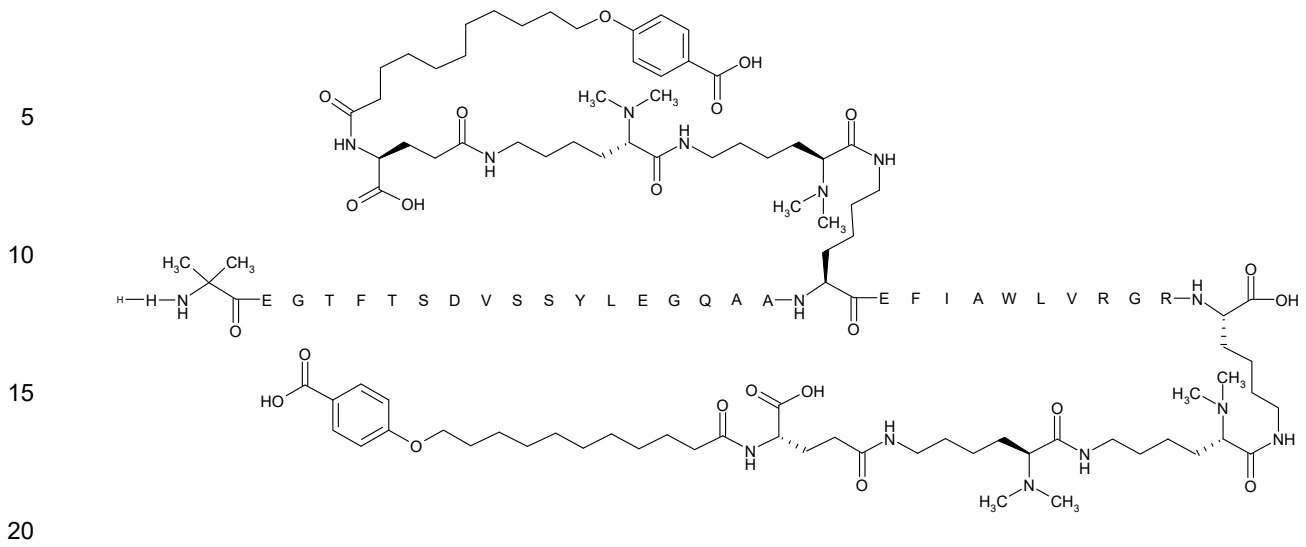
30 Quím. 56:



55  $N^{26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Gln<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

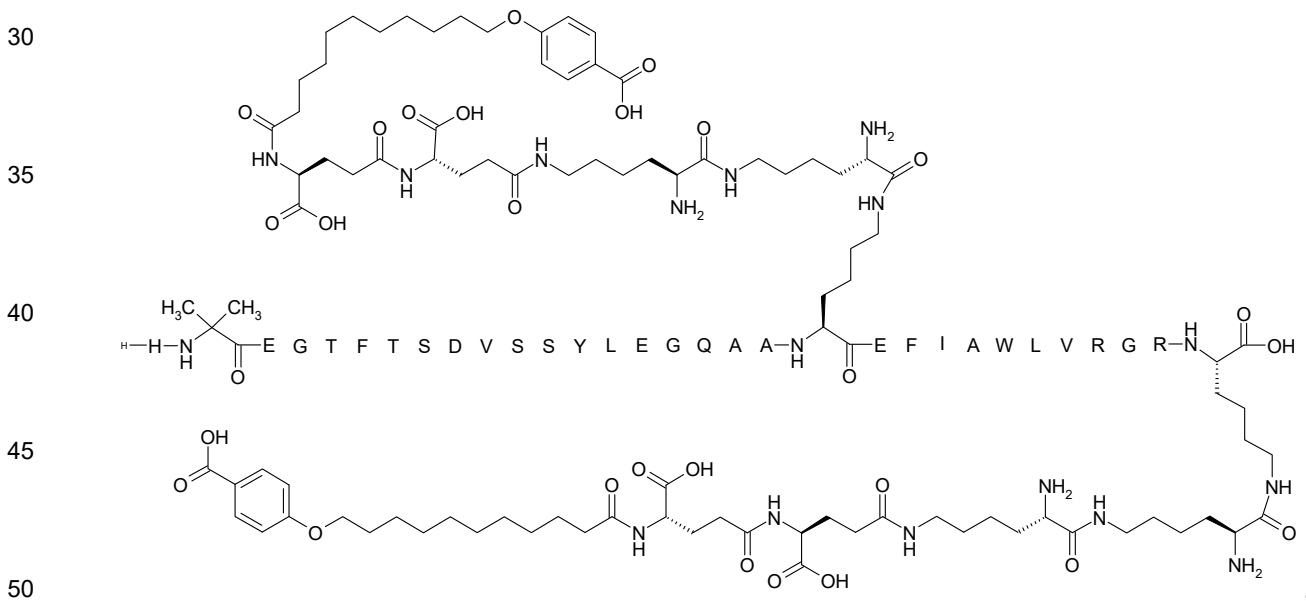
60 Quím. 57:

65



25  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-6-[[[(2S)-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]amino]-2-(dimetilamino)hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 58:

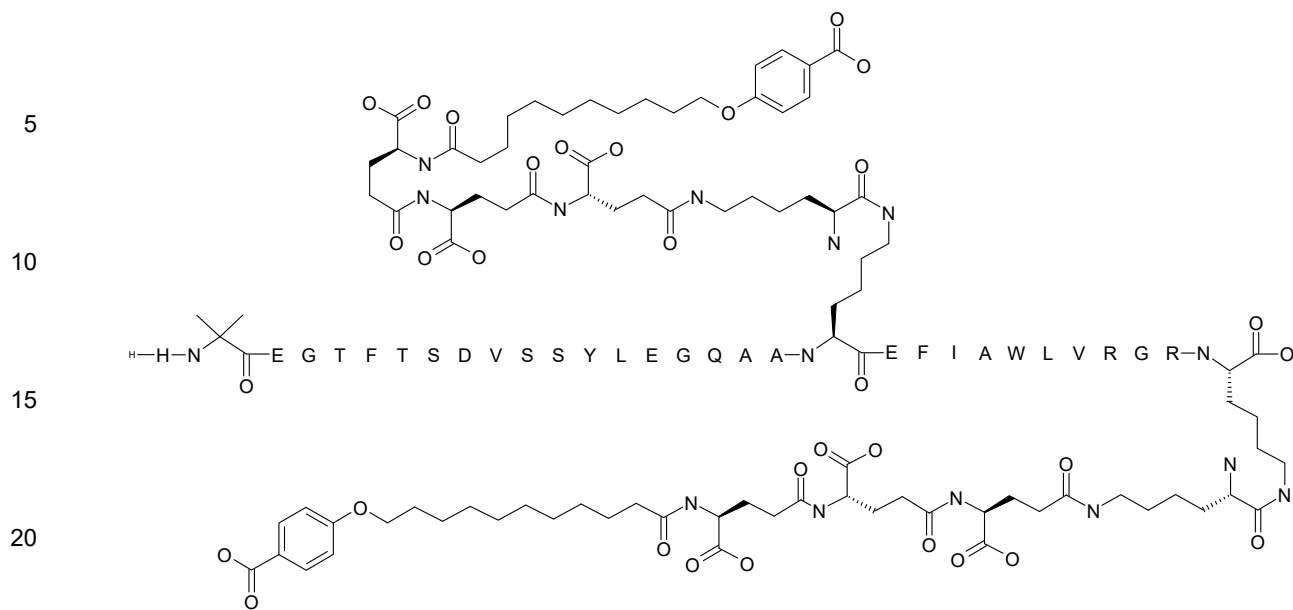


55  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 59:

60

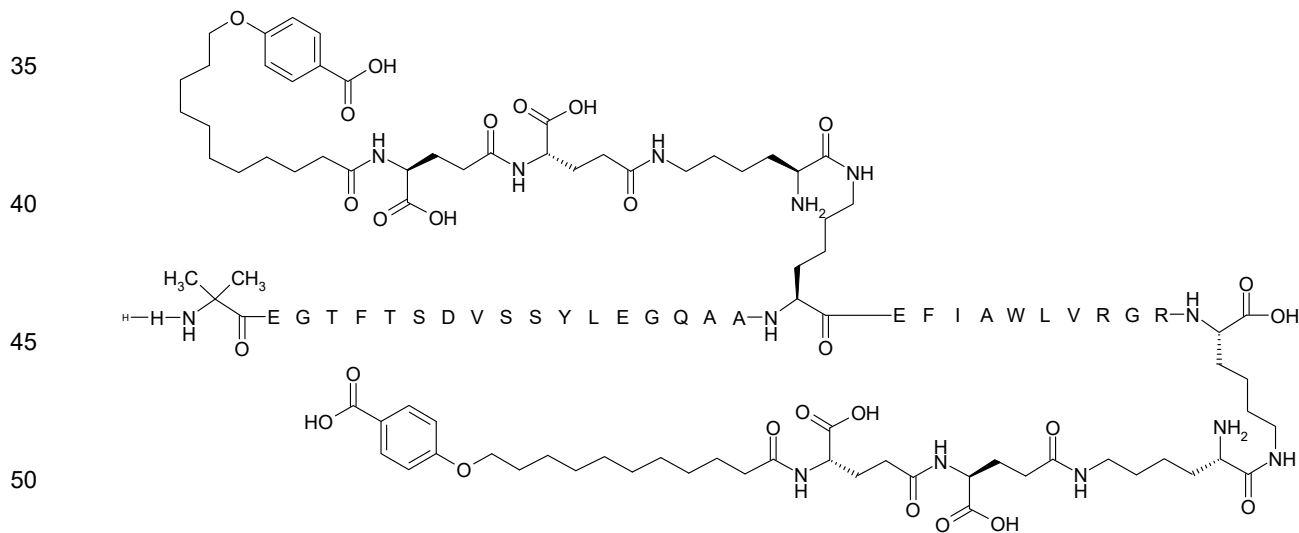
65



25 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-  
 carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-  
 4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-  
 carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-  
 37)-péptido,

30

Quím. 60:

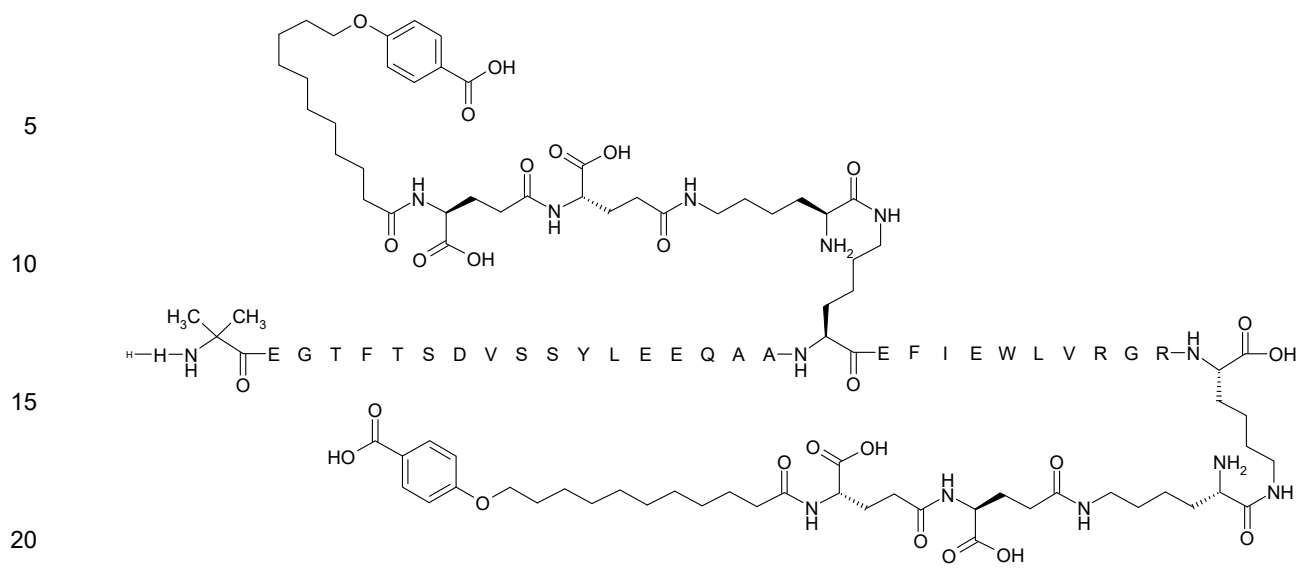


55 N<sup>ε26</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-  
 carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil], N<sup>ε37</sup>-[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-  
 [[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-  
 GLP-1-(7-37)-péptido,

60

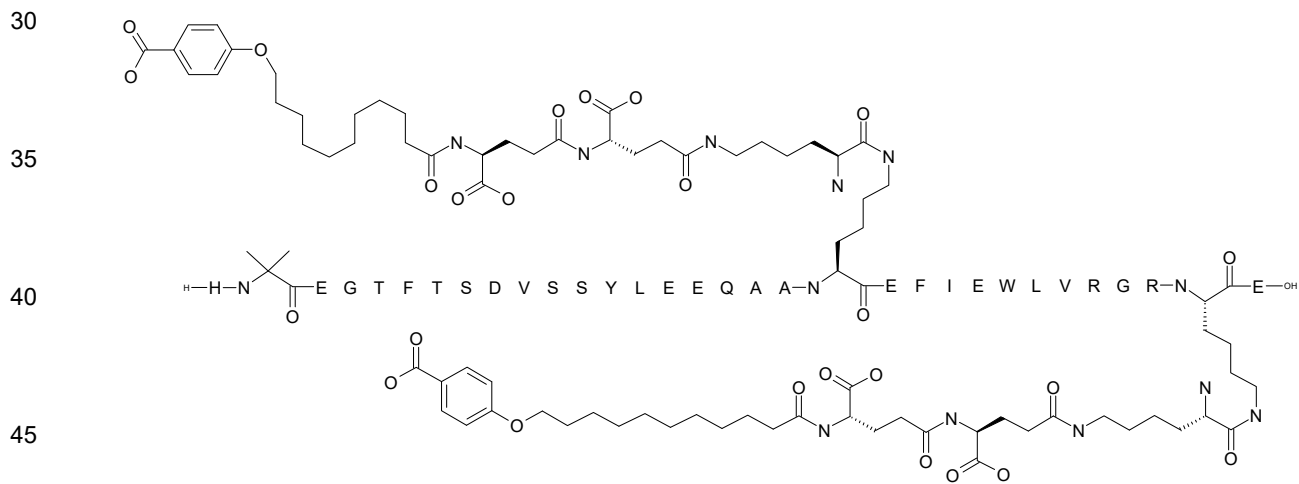
Quím. 61:

65



25  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Glu<sup>30</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-péptido,

Quím. 62:



50  $N^{\epsilon 26}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil],  $N^{\epsilon 37}$ -[(2S)-2-amino-6-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]hexanoil]-[Aib<sup>8</sup>,Glu<sup>22</sup>,Glu<sup>30</sup>,Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>37</sup>]-GLP-1-(7-37)-peptidil-Glu,

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

12. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para el uso como un medicamento.

13. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes, trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales, y/o síndrome del ovario poliquístico; y/o para retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética.