

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 839**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2013** **PCT/EP2013/063004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014** **WO14005858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013** **E 13737808 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2866825**

54 Título: **Uso de péptidos GLP-1 de acción prolongada**

30 Prioridad:

01.07.2012 EP 12174535
30.08.2012 US 201261694837 P
01.10.2012 EP 12186781
01.10.2012 US 201261708162 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JENSEN, CHRISTINE BJØRN;
RASMUSSEN, MADSE FREDERIK;
ZDRAVKOVIC, MILAN y
KRISTENSEN, PETER

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 2 796 839 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

Uso de péptidos GLP-1 de acción prolongada

5 Resumen

La presente invención se refiere a una composición que comprende la semaglutida agonista del GLP-1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad, en donde dicho uso comprende la administración de dicho agonista del GLP-1 en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana; y dicha composición (i) comprende un agente isotónico, (ii) está en la forma de una formulación acuosa que comprende al menos 80 % p/p de agua, o (iii) está en la forma de una formulación acuosa con pH entre 3 y 10. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el cambio en HbA1c después de la administración subcutánea de placebo, semaglutida o liraglutida a sujetos humanos. * $p < 0,05$ frente al placebo; ** $p < 0,001$ frente al placebo (basado en las medias ajustadas). Los valores de referencia son solo para información: los datos se ajustan al modelo para la HbA1c de referencia. Los datos son las medias LS ajustadas al modelo, FAS LOCF. Las estimaciones provienen de un modelo ANOVA con tratamiento, país y tratamiento previo como efectos fijos y HbA1c de referencia como covariable.

La Figura 2 muestra el cambio medio en HbA1c desde la referencia frente al tiempo; los datos son medias (1,96SE), FAS LOCF. Los tratamientos son placebo (A); semaglutida 0,1 mg (B, línea discontinua), 0,2 mg (C), 0,4 mg (D), 0,8 mg (E), 0,8 mg T (F, línea discontinua), 1,6 mg T (G); liraglutida 1,2 mg (H), 1,8 mg (I).

La Figura 3 muestra sujetos que alcanzan los criterios AACE o ADA para el control glucémico. El número de pacientes que alcanzan los criterios por tratamiento se indica en cada barra. Los tratamientos son placebo (A); semaglutida 0,1 mg (B), 0,2 mg (C), 0,4 mg (D), 0,8 mg (E), 0,8 mg T (F), 1,6 mg T (G); liraglutida 1,2 mg (H), 1,8 mg (I). * $p < 0,05$ frente al placebo; ** $p < 0,001$ frente al placebo; *** $p < 0,0001$ frente al placebo (basado en las medias ajustadas). Los datos son FAS LOCF. Las estimaciones provienen de un modelo de regresión logística de tratamiento, país y tratamiento previo como efectos fijos y la HbA1c de referencia como covariable. ADA, Asociación Americana de Diabetes; AACE, Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos.

La Figura 4 muestra el cambio medio del peso corporal frente al tiempo; los datos son medias (1,96SE), FAS LOCF. Los tratamientos son placebo (A); semaglutida 0,1 mg (B, línea discontinua), 0,2 mg (C), 0,4 mg (D), 0,8 mg (E), 0,8 mg T (F, línea discontinua), 1,6 mg T (G); liraglutida 1,2 mg (H), 1,8 mg (I).

La Figura 5 muestra el cambio del peso corporal desde la referencia en la semana 12. ** $p < 0,001$ frente al placebo; *** $p < 0,0001$ frente al placebo (basado en las medias ajustadas). †: Valores de referencia solo para información: los datos se ajustan al modelo para el peso de referencia. Los datos son las medias LS ajustadas al modelo, FAS LOCF. Las estimaciones provienen de un modelo ANOVA con el tratamiento, el país y el tratamiento previo como efectos fijos y el peso de referencia como covariable.

SE: Error estándar. FAS: Conjunto de análisis completo. LOCF: Última observación llevada adelante.

Descripción

El documento WO2011/138421 se refiere a las terapias para las enfermedades metabólicas, que incluye la obesidad, que comprenden la administración combinada de un agonista del receptor del GLP-1 (opcionalmente la semaglutida) y un inhibidor de DPP-4. La presente descripción se refiere a un uso mejorado de los agonistas del GLP-1 en la terapia. En una modalidad la descripción se refiere a ciertos regímenes de dosificación de los agonistas del GLP-1 que proporcionan un efecto mejorado en las enfermedades o afecciones, tales como la prevención y/o tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad. En una modalidad, los métodos de la presente descripción proporcionan sorprendentemente una reducción mejorada de la HbA1c y una reducción del peso corporal. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad que proporciona una mejora a) en la reducción de HbA1c o b) en la reducción del peso corporal en comparación con la administración de 1,8 mg o menos de liraglutida, tal como 0,8 mg o menos de liraglutida, por día.

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para a) la reducción de HbA1c; b) la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina; o c) la prevención o tratamiento de la obesidad, mediante la reducción del peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o mediante la inducción de saciedad; en donde dicho método comprende la administración de un agonista del GLP-1 a un sujeto que lo necesita, en donde dicho agonista del GLP-1 i) tiene una vida media de al menos 72 horas, en donde dicha vida media se determina opcionalmente mediante el Ensayo (II); ii) se administra en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal una cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana; y iii) se administra una vez por semana o con menos frecuencia.

En una modalidad, la descripción se refiere a un agonista del GLP-1 para su uso en a) la reducción de HbA1c; b) la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina; o c) la prevención o el tratamiento de la obesidad, para reducir el peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o para inducir saciedad; en donde dicho uso comprende la administración de dicho agonista del GLP-1 en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana, y en donde dicho agonista del GLP-1 y/o la administración es opcionalmente como se define en la presente descripción.

En una modalidad, la descripción se refiere a una composición que comprende un agonista del GLP-1 para su uso en a) la reducción de HbA1c; b) la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina; o c) la prevención o el tratamiento de la obesidad, para reducir el peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o para inducir saciedad; en donde dicho agonista del GLP-1 i) tiene una vida media de al menos 72 horas, en donde dicha vida media se determina opcionalmente por el Ensayo (II); y ii) se administra en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana; y en donde dicha composición se administra una vez a la semana o con menos frecuencia, y en donde dicho agonista y/o la administración de GLP-1 opcionalmente es como se define en la presente descripción.

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para la reducción de HbA1c o para la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina, dicho método que comprende la administración de un agonista del GLP-1 a un sujeto que lo necesita en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el método es para la reducción de HbA1c. En una modalidad, el método es para la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2. En una modalidad, el método es para la prevención o el tratamiento de la hiperglucemia. En una modalidad, el método es para la prevención o el tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa. En una modalidad, el método es para la prevención o el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina. En una modalidad, el método de la descripción comprende retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética. En una modalidad, se alcanza un nivel de HbA1c por debajo de 7 %. En una modalidad, el nivel de HbA1c se determina de acuerdo con el método definido por el ensayo de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT). En una modalidad, el nivel de HbA1c se determina de acuerdo con el método definido por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para tratar o prevenir la obesidad, para la reducción del peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o para inducir saciedad, dicho método que comprende la administración de un agonista del GLP-1 a un sujeto que lo necesita en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el método es para la prevención o el tratamiento de la obesidad. En una modalidad, el método es para la reducción del peso corporal y/o la ingestión de alimentos. En una modalidad, el método es para inducir saciedad.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 tiene una vida media de al menos 24 horas, tal como al menos 48 horas, al menos 60 horas o al menos 72 horas, o tal como al menos 84 horas, al menos 96 horas, o al menos 108 horas, u opcionalmente al menos 120 horas, al menos 132 horas, o al menos 144 horas, en donde dicha vida media se determina opcionalmente mediante el Ensayo (II).

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra dos veces por semana o con menos frecuencia, una vez por semana o con menos frecuencia, o una vez por semana o con menos frecuencia. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra una vez cada dos semanas o con menos frecuencia, una vez cada tres semanas o con menos frecuencia, o una vez al mes o con menos frecuencia.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 0,8 mg, al menos 0,9 mg o al menos 1,0 mg. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 1,1 mg, al menos 1,2 mg o al menos 1,3 mg. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 1,4 mg, al menos 1,5 mg o al menos 1,6 mg.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana equivalente a al menos 0,8 mg, al menos 0,9 mg o al menos 1,0 mg de semaglutida. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana equivalente a al menos 1,1 mg, al menos 1,2 mg o al menos 1,3 mg de semaglutida. En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana equivalente a al menos 1,4 mg, al menos 1,5 mg o al menos 1,6 mg de semaglutida.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en semaglutida, exenatida, albiglutida y dulaglutida.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra mediante administración parenteral, tal como inyección subcutánea.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 es un péptido GLP-1.

En una modalidad, el péptido GLP-1 es un péptido GLP-1 protegido con DPPIV. En una modalidad, el péptido GLP-1 se estabiliza con DPPIV.

5 En una modalidad, el agonista del GLP-1 tiene una CE_{50} de 3000 pM o más abajo, tal como de 500 pM o más abajo o de 100 pM o más abajo, determinada opcionalmente mediante el Ensayo (I).

10 En una modalidad, la descripción se refiere a un agonista del GLP-1 para su uso en la reducción de HbA1c o para su uso en la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina que comprende administrar un agonista del GLP-1 en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el agonista y/o la administración de GLP-1 es como se define en la presente descripción.

15 En una modalidad, la descripción se refiere a un agonista del GLP-1 para su uso en la prevención o tratamiento de la obesidad, en la reducción del peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o en la inducción de saciedad que comprende administrar un agonista del GLP-1 en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el agonista y/o la administración de GLP-1 es como se define en la presente descripción.

20 En una modalidad, la descripción se refiere a una composición que comprende un agonista del GLP-1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en la reducción de HbA1c o para la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia, la tolerancia alterada a la glucosa o la diabetes no dependiente de insulina, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el agonista y/o la administración de GLP-1 es como se define en la presente descripción.

25 En una modalidad, la descripción se refiere a una composición que comprende un agonista del GLP-1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad, en la reducción del peso corporal y/o la ingestión de alimentos, o en la inducción de saciedad, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana, tal cantidad equivalente a al menos 0,7 mg de semaglutida por semana. En una modalidad, el agonista y/o la administración de GLP-1 es como se define en la presente descripción.

30 En una modalidad, el agonista del GLP-1 se administra con otro agente terapéutico. La administración con otro agente terapéutico puede llevarse a cabo como administración del agonista del GLP-1 y el otro agente terapéutico dentro de la misma ventana terapéutica (por ejemplo, dentro de un período de dos semanas, un período de una semana, o en un período de 96, 72, o 48 horas, etc.). El tratamiento con un agonista del GLP-1 de acuerdo con la presente descripción se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, seleccionados a partir de los agentes antidiabéticos, los agentes antiobesidad, los agentes reguladores del apetito, los agentes antihipertensivos, los agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes o asociados con la diabetes y los agentes para el tratamiento y/o la prevención de las complicaciones y trastornos resultantes o asociados con la obesidad; ejemplos de estos agentes terapéuticos son: sulfonilureas, tiazolidinedionas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de la glucosidasa, antagonistas del glucagón y los inhibidores de la DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV).

45 En una modalidad, como se usa en la presente descripción, una "cantidad equivalente a" cuando es usado en relación con los agonistas del GLP-1 se refiere a cantidades de un primer agonista del GLP-1 y un segundo agonista del GLP-1 que tiene una potencia de receptor de GLP-1 (es decir, CE_{50}) dentro de $\pm 30\%$, tal como dentro de $\pm 20\%$ o dentro de $\pm 10\%$, entre sí, opcionalmente determinado por el Ensayo (I) que se describe en la presente descripción y que tiene una vida media dentro de $\pm 30\%$, tal como dentro de $\pm 20\%$ o dentro de $\pm 10\%$, uno del otro opcionalmente determinado por el Ensayo (II) que se describe en la presente descripción.

50 En una modalidad una "cantidad efectiva" de un agonista del GLP-1 como se usa en la presente descripción se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar, o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad o estado y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad efectiva". Las cantidades efectivas para cada propósito dependen de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como también del peso y estado general del sujeto. Se debe entender que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse mediante el uso de la experimentación rutinaria, mediante la construcción de una matriz de valores y la evaluación de diferentes puntos en la matriz, lo que está dentro de las habilidades ordinarias de un médico o veterinario entrenado.

60 En una modalidad, el término "tratamiento" o "tratar" como se usa en la presente descripción se refieren al manejo y a la atención de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. En una modalidad, el término "tratamiento" o "tratar" pretenden incluir el espectro completo de tratamientos para una afección dada que sufre el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones; para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección; para aliviar o calmar los síntomas y las complicaciones; y/o, para curar o eliminar la enfermedad, trastorno, o afección, así como también para prevenir la afección. En una modalidad, la prevención se debe entender como el manejo y la atención de un paciente con el

propósito de combatir la enfermedad, afección, o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el comienzo de los síntomas o complicaciones.

5 En una modalidad el término "separador hidrófilo" como se usa en la presente descripción se refiere a un separador que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina con un resto químico que comprende al menos 5 átomos que no son de hidrógeno, donde el 30-50 % de estos son N u O.

10 En una modalidad el término "análogo", como se usa en la presente descripción con referencia a un polipéptido, significa un péptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos del péptido y/o en donde se han añadido uno o más residuos de aminoácidos al péptido. Tal adición o eliminación de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. Se usa un sistema simple para describir los análogos: Por ejemplo [Arg³⁴]GLP-1 (7-37) Lys designa un análogo del GLP-1 en donde la lisina de origen natural en la posición 34 se ha sustituido con arginina y un residuo de lisina se ha añadido al C-terminal (posición 38).

15 En una modalidad el término "péptido GLP-1" como se usa en la presente descripción significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

20 En una modalidad el término "péptido exendina-4" como se usa en la presente descripción se refiere a la exendina-4 (1-39), un análogo de la exendina-4, un derivado de la exendina-4 o un derivado de un análogo de la exendina-4.

25 En una modalidad el término "protegido frente a la DPP-IV", como se usa en la presente descripción como referencia a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que se ha modificado químicamente para hacer que dicho compuesto sea resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV). Se conoce que la enzima DPP-IV en plasma se implica en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ejemplo la GLP-1, la Exendina-4 etcétera. Por lo tanto, se realiza un esfuerzo considerable para desarrollar agonistas del GLP-1 menos susceptibles a la hidrólisis mediada por DPP-IV con el fin de reducir la velocidad de degradación por DPP-IV.

30 La presente descripción también se refiere a un agonista del GLP-1 para su uso como medicamento. En modalidades particulares, el agonista del GLP-1 puede usarse para los siguientes tratamientos médicos:

35 (i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como la hiperglucemia, la diabetes tipo 2, la tolerancia alterada a la glucosa, la diabetes tipo 1, la diabetes no dependiente de insulina, la MODY (diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), la diabetes gestacional, y/o para la disminución de la HbA1c;

(ii) retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión a la diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a la 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;

40 (iii) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingestión de alimentos, la reducción del peso corporal, la supresión del apetito, la inducción de la saciedad; el tratamiento o la prevención del trastorno por atracón, la bulimia nerviosa y/o la obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; la reducción de la motilidad gástrica; y/o mediante el retraso del vaciamiento gástrico.

45 En otra modalidad particular, la indicación es (i). En una modalidad particular adicional, la indicación es (ii). En todavía una modalidad particular, la indicación es (iii). En una modalidad la indicación es la diabetes tipo 2 y/o la obesidad.

50 En una modalidad el método comprende la prevención, el tratamiento, la reducción y/o la inducción en una o más enfermedades o afecciones definidas en la presente descripción. En una modalidad la indicación es (i) y (iii). En una modalidad la indicación es (ii) y (iii). En una modalidad el método comprende la prevención, el tratamiento, la reducción y/o la inducción en una o más enfermedades o afecciones seleccionadas a partir de a) y b), a) y c), b) y c), o a), b) y c) como se define en la reivindicación 1.

55 En una modalidad la descripción se refiere a la administración de una cantidad efectiva de un agonista del GLP-1.

En una modalidad, como se usa en la presente descripción, los valores específicos dados en relación con números o intervalos pueden entenderse como el valor específico o como aproximadamente el valor específico.

60 Propiedades funcionales

65 En un primer aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 de la descripción tienen una buena potencia. También, o alternativamente, en un segundo aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 de la descripción tienen un perfil farmacocinético prolongado. También, o alternativamente, en un tercer aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 de la descripción son estables contra la degradación por las enzimas gastrointestinales.

Actividad biológica (potencia)

De acuerdo con el primer aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 de la descripción son biológicamente activos, o potentes. En una modalidad particular, "potencia" y/o "actividad" se refiere a la potencia in vitro, es decir al rendimiento en un ensayo de receptor de GLP-1 funcional, más en particular a la capacidad de estimular la formación de cAMP en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado.

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

En una modalidad el término concentración efectiva semimáxima (CE₅₀) se refiere generalmente a la concentración que induce la mitad de una respuesta entre el valor de referencia y el máximo, en referencia a la curva de respuesta a la dosis. La CE₅₀ se usa como una medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración donde se observa el 50 % de su efecto máximo.

La potencia in vitro de los agonistas del GLP-1 se puede determinar como se describió anteriormente, y la CE₅₀ del agonista del GLP-1 determinado en cuestión. A menor EC₅₀, mejor la potencia.

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

En una modalidad particular adicional, el agonista del GLP-1 tiene una potencia in vitro que corresponde a un CE₅₀ igual o más abajo de 3000 pM, tal como más abajo de 2000 pM, más abajo de 1000 pM o más abajo de 500 pM, o tal como más abajo de 200 pM o más abajo de 100 pM.

En otra modalidad particular los agonistas del GLP-1 son potentes in vivo, lo que puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como también en ensayos clínicos.

El ratón db/db diabético es un ejemplo de un modelo animal adecuado y el efecto de la disminución de glucosa en sangre pueden determinarse en tales ratones in vivo, por ejemplo como se describió en el Ensayo (III), o como se describió en el Ejemplo 43 del documento WO09/030738.

También, o alternativamente, el efecto sobre la ingestión de alimentos in vivo puede determinarse en estudios farmacodinámicos en cerdos, por ejemplo como se describió en el Ensayo (IV).

Prolongación - vida media in vivo en minicerdos

De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 de la descripción son prolongados. En una modalidad particular la prolongación puede determinarse como el tiempo de vida media (T_½) in vivo en minicerdos después de la administración i.v. En modalidades adicionales, la vida media es de al menos 24 horas, tal como al menos 48 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, o tal como al menos 84 horas, al menos 96 horas o al menos 108 horas.

Un ensayo adecuado para determinar el tiempo de vida media in vivo en los minicerdos después de la administración i.v. se describe en el Ensayo (II).

Degradación por enzimas gastrointestinales

De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los agonistas del GLP-1 son estables, o se estabilizan, contra la degradación por una o más enzimas gastrointestinales.

Las enzimas gastrointestinales incluyen, sin limitación, exo y endo peptidasas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasas y carboxipeptidasas. La estabilidad puede probarse contra estas enzimas gastrointestinales en la forma de enzimas purificadas, o en la forma de extractos del sistema gastrointestinal.

En una modalidad particular, el agonista del GLP-1 tiene una vida media in vitro (T_½), en un extracto de intestino delgado de rata, dividido por la vida media correspondiente (T_½) de GLP-1(7-37), de al menos 1, tal como por encima de 1,0, al menos 1,2, al menos 2,0, o tal como al menos 3,0, o al menos 4,0. En otras palabras, puede definirse una relación (SI) para cada agonista del GLP-1, a saber como la vida media in vitro (T_½) del agonista del GLP-1 en cuestión, en un extracto de intestino delgado de rata, dividido por la vida media correspondiente (T_½) de GLP-1(7-37).

En el Ensayo (V) se describe un ensayo adecuado para determinar la vida media in vitro en un extracto de intestino delgado de rata.

Agonistas de glp-1

En una modalidad, los agonistas del GLP-1 de la invención tienen actividad GLP-1. En una modalidad, se entiende que "un agonista del GLP-1" se refiere a cualquier compuesto, que incluye péptidos y compuestos no peptídicos, que activan total o parcialmente el receptor de GLP-1 humano. En una modalidad, el "agonista del GLP-1" es cualquier molécula pequeña peptídica o no peptídica que se une a un receptor de GLP-1, preferentemente con una constante de afinidad (K_D) o una potencia (CE_{50}) más abajo de 1 μM , por ejemplo, más abajo de 100 nM, como se mide mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 98/08871). En una modalidad, los métodos para identificar agonistas del GLP-1 se describen en el documento WO 93/19175 (Novo Nordisk A/S) y los ejemplos de agonistas del GLP-1 adecuados que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen los referidos en el documento WO 2005/027978 (Novo Nordisk A/S). "Actividad de GLP-1" se refiere a la capacidad de unirse al receptor de GLP-1 e iniciar una trayectoria de transducción de señales que resulta en la acción insulínica u otros efectos fisiológicos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los agonistas del GLP-1 de la invención pueden analizarse para determinar la actividad de GLP-1 mediante el uso del ensayo descrito en el Ensayo (I) en la presente descripción.

En otra modalidad más, el agonista del GLP-1 es un agonista del GLP-1 estable. Como se usa en la presente descripción, "un agonista del GLP-1 estable" se refiere a un agonista del GLP-1 que exhibe una vida media de eliminación en plasma in vivo de al menos 24 horas en el hombre, opcionalmente determinada mediante el método descrito más abajo. Se pueden encontrar ejemplos de agonistas del GLP-1 estables en el documento WO2006/097537.

En una modalidad, el método para determinar la vida media de eliminación en plasma de un compuesto en el hombre puede llevarse a cabo de la siguiente manera: El compuesto se disuelve en un tampón isotónico, pH 7,4, PBS o cualquier otro tampón adecuado. La dosis se inyecta periféricamente, preferentemente en el abdomen o la parte superior del muslo. Se toman muestras de sangre para la determinación del compuesto activo a intervalos frecuentes y durante un tiempo suficiente para recubrir la parte de eliminación terminal (por ejemplo, Predosis, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 (día 2), 36 (día 2), 48 (día 3), 60 (día 3), 72 (día 4) y 84 (día 4) horas después de la dosis). La determinación de la concentración del compuesto activo se realiza como se describió en Wilken y otros, *Diabetologia* 43 (51), 2000. Los parámetros farmacocinéticos derivados se calculan a partir de los datos de concentración-tiempo para cada sujeto individual mediante el uso de métodos no compartimentales, con el uso del software WinNonlin Versión 2.1 comercialmente disponible (Pharsight, Cary, NC, EE.UU.). La constante de velocidad de eliminación terminal se estima mediante regresión logarítmica lineal en la parte logarítmica lineal terminal de la curva de concentración-tiempo, y es usado para calcular la vida media de eliminación.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se formula para tener una vida media en el hombre de al menos 48 horas. Esto puede obtenerse mediante formulaciones de liberación sostenida conocidas en la técnica.

En una modalidad, el péptido GLP-1 es semaglutida. El documento WO 06/097537 describe la semaglutida (Ejemplo 4), un agonista del GLP-1 mono-acilado para una administración semanal.

En una modalidad, la presente descripción abarca sales farmacéuticamente aceptables de los agonistas del GLP-1. Tales sales incluyen sales por adición de ácidos aceptables farmacéuticamente, sales metálicas aceptables farmacéuticamente, sales de amonio y de amonio alquiladas. También se pretende que las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables sean los hidratos que pueden formar los presentes agonistas del GLP-1.

En una modalidad la ruta de administración de los agonistas del GLP-1 puede ser cualquier ruta que transporte efectivamente el compuesto activo al sitio de acción apropiado o conveniente, tal como parenteral. En una modalidad, los medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden el agonista del GLP-1, tal como la semaglutida, pueden administrarse por vía parenteral a un paciente que lo necesita. En una modalidad la administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo lapicera.

Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser un polvo o un líquido para la administración de un agonista del GLP-1 en forma de aerosol nasal o pulmonar. Como todavía una opción adicional, el agonista del GLP-1 también puede administrarse transdérmicamente, por ejemplo, desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o transmucosalmente, por ejemplo, bucalmente. Las formas posibles mencionadas anteriormente de administrar los agonistas del GLP-1 no deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

En una modalidad, el agonista del GLP-1 se coadministra junto con un agente activo terapéuticamente adicional usado en los tratamientos definidos en la presente descripción.

El Péptido Similar al Glucagón-1 Humano es GLP-1(7-37) y tiene la secuencia HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI
AWLVKGRG (SEQ ID NO: 1). El GLP-1(7-37) también puede designarse GLP-1 "nativo". En el listado de
secuencias, el primer residuo de aminoácido de la sec. con núm de ident. 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 de aminoácidos subsecuentes se enumeran en consecuencia, terminando con la glicina
núm. 37. Por lo tanto, generalmente, cualquier referencia en la presente descripción al número del residuo de
aminoácido o a 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. Un ejemplo no limitante de la nomenclatura de un análogo adecuada
es [Aib⁸Arg³⁴Lys³⁷]GLP-1(7-37), que designa un análogo de GLP-1(7-37), en el que la alanina en la posición 8 se
sustituye por ácido α -aminoisobutírico (Aib), la lisina en la posición 34 se sustituye por arginina, y la glicina en la
posición 37 se sustituye por lisina.

La concentración en plasma de los agonistas del GLP-1 puede determinarse mediante el uso de cualquier método
adecuado. Por ejemplo, puede usarse la LC-MS (Espectroscopía de Masas acoplada a Cromatografía Líquida), o
inmunoensayos tales como el RIA (Radio Inmuno Ensayo), el ELISA (Ensayo Inmuno Sorbente ligado a Enzimas) y el
LOCI (Inmunoensayo de Luminiscencia de Canalización de Oxígeno). Los protocolos generales para ensayos RIA y
ELISA adecuados se encuentran en, por ejemplo, el documento WO99/030738 en las págs. 116-118. Un ensayo
preferente es el LOCI (Inmunoensayo de Canalización de Oxígeno Luminiscente), generalmente como se describió
para la determinación de insulina por Poulsen y Jensen en Journal of Biomolecular Screening 2007, vol. 12, p. 240-
247 - brevemente, se pueden recoger muestras de sangre a los intervalos convenientes, separar el plasma,
congelarlas inmediatamente y mantenerlas a -20 °C hasta que se analice la concentración en plasma del respectivo
agonista del GLP-1; las perlas donantes se recubren con estreptavidina, mientras que las perlas aceptoras se conjugan
con un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo mitad-/C-terminal del péptido; otro anticuerpo monoclonal,
específico para el N-terminal, está biotinilado; los tres reactivos se combinan con el analito y forman un
inmunocomplejo de dos sitios; la iluminación del complejo libera átomos de oxígeno singlete de las perlas donantes,
que se canalizan hacia las perlas aceptoras y desencadenan quimioluminiscencia que puede medirse en un lector de
placas Envision; la cantidad de luz es proporcional a la concentración del compuesto.

En una modalidad, el término "Aib", como se usa en la presente descripción, se refiere a ácido α -aminoisobutírico.

Composiciones farmacéuticas

Una dosis administrada puede contener de 5 mg - 100 mg del agonista del GLP-1, o de 5-50 mg, o de 5-20 mg, o de
5-10 mg del agonista del GLP-1.

En una modalidad, la composición es BYDUREON® (una fórmula de liberación prolongada de exenatida en partículas
de PLGA).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del GLP-1 o una sal, amida o éster farmacéuticamente
aceptables de éste y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden prepararse como se conoce en la técnica.

En una modalidad 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. En la técnica se conoce la formulación de ingredientes activos farmacéuticamente
con diversos excipientes, véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo 19^{na}
edición (1995) y cualquiera de las ediciones posteriores). Los ejemplos de excipientes no limitantes son: solventes,
diluyentes, tampones, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad (por ejemplo, agentes isotónicos), agentes
quelantes, estabilizadores (por ejemplo, inhibidores de oxidación, inhibidores de la agregación, surfactantes y/o
inhibidores de proteasa).

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

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

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.

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 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 suaves; 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 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 suministro de fármacos, por ejemplo para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la solubilidad. En una modalidad particular, una composición puede unirse a tal sistema a través de interacciones covalentes, hidrófobas y/o electrostáticas. El propósito de tal composición puede ser, por ejemplo, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia y/o aumentar la satisfacción del paciente.

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

La composición puede administrarse por administración parenteral. 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.

Procesos de producción

En una modalidad los péptidos GLP-1 pueden producirse por derivatización apropiada de una cadena principal peptídica apropiada que se ha producido mediante tecnología de ADN recombinante o mediante síntesis peptídica (por ejemplo, síntesis en fase sólida de tipo Merrifield) como se conoce en la técnica de síntesis de péptidos y química de péptidos.

En una modalidad la producción de péptidos como GLP-1(7-37) y análogos de GLP-1 se conoce bien en la técnica. La porción GLP-1 del péptido GLP-1 de la invención (o los fragmentos de éste) puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica clásica, por ejemplo, síntesis peptídica en fase sólida mediante el uso de química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, véase, 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.

En una modalidad los agonistas del GLP-1 pueden producirse por métodos recombinantes, a saber, mediante el cultivo de una célula hospedero que contiene una secuencia de ADN que codifica el agonista del GLP-1 y es capaz de expresar el péptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión del péptido. Los ejemplos de células hospederas adecuadas para la expresión de estos péptidos no limitantes son: Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, así como también, líneas celulares BHK o CHO de mamíferos.

En una modalidad los agonistas del GLP-1 de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o un mimético monopéptido o dipéptido unido covalentemente en el extremo N-terminal pueden, por ejemplo, producirse como se describió en la parte experimental. O véase, 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".

Ejemplo 1: El péptido Glp-1 semaglutida proporciona HbA1c y peso corporal reducidos

La semaglutida es un péptido GLP-1 acilado único con una vida media de 160 horas. El objetivo fue investigar la respuesta a la dosis de HbA1c de dosis una vez a la semana de semaglutida (cinco niveles de dosis) en sujetos con diabetes tipo 2. También se investigaron la seguridad, la tolerabilidad y la farmacodinámica de la semaglutida frente al placebo y la liraglutida abierta una vez al día.

Materiales y métodos

La liraglutida se puede preparar como se describió en el Ejemplo 37 del documento WO98/08871. La semaglutida puede prepararse como se describió en el Ejemplo 4 del documento WO2006/097537. La composición de los agonistas del GLP-1 administrados puede formularse como soluciones acuosas isotónicas con un tampón de fosfato, tal como un tampón de dihidrógeno fosfato de sodio, que tiene un pH en el intervalo de 7,0-9,0, tal como pH 7,4 o pH 8,15, por ejemplo que comprende además los excipientes propilenglicol y fenol. La composición de los agonistas del GLP-1 administrados puede ser como se describió en los documentos WO2003/002136 o WO2005/049061. La composición de placebo puede ser idéntica a la composición de los agonistas del GLP-1, pero no que contiene un agonista del GLP-1.

En un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de 12 semanas, se expusieron 411 sujetos humanos (n = 43-50 por grupo) con diabetes tipo 2. Los participantes (hombres/mujeres 65/35 %; HbA1c de referencia (media $\pm$ SD) 8,1 $\pm$ 0,8 %; peso corporal de referencia 87,5 $\pm$ 13,8 kg; duración de la diabetes 2,6 $\pm$ 3,1 años; solo metformina/solo dieta y ejercicio 80/20 %) recibieron una inyección subcutánea de una de las cinco dosis de

semaglutida (0,1–1,6 mg) una vez a la semana, liraglutida abierta (1,2 mg, 1,8 mg) una vez al día o placebo una vez a la semana. Dos de las dosis de semaglutida se titularon (T) en incrementos semanales de 0,4 mg. El criterio de valoración principal fue el cambio en HbA1c a partir de la referencia. Los criterios de valoración secundarios de la eficacia incluyeron la proporción de sujetos que alcanzaron el objetivo de ADA HbA1c (<7 %) y cambio en el peso corporal. El cambio y el porcentaje al objetivo se analizaron por ANOVA y regresión logística, respectivamente. Las comparaciones entre semaglutida y liraglutida no se corrigieron por multiplicidad. Las características de referencia de los sujetos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de referencia de los sujetos

	Placebo	Semaglutida						Liraglutida	
		0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	0,8 mg	0,8 mg T	1,6 mg T	1,2 mg	1,8 mg
Sujetos expuestos*	46	47	43	48	42	43	47	45	50
D&E: metformina (%)	22:78	23:77	14:86	23:77	19:81	16:84	19:81	18:82	24:76
Mujer: hombre (%)	39:61	34:66	30:70	23:77	48:52	37:63	45:55	31:69	30:70
Edad (años)	55,3 (10,6)	55,2 (10,1)	54,7 (10,0)	53,8 (10,2)	55,0 (9,7)	55,9 (7,9)	56,4 (10,5)	54,8 (9,2)	54,3 (10,1)
Duración de la diabetes (años)	2,4 (3,3)	3,6 (5,0)	2,3 (2,7)	2,0 (2,3)	3,0 (3,0)	2,6 (2,1)	1,8 (2,0)	3,3 (3,4)	2,5 (2,6)
HbA1c (%)	8,1 (0,8)	8,2 (0,9)	8,2 (0,9)	8,1 (0,9)	8,2 (0,9)	8,0 (0,8)	8,0 (0,7)	8,0 (0,8)	8,1 (0,7)
FPG (mmol/l)	8,9 (1,5)	9,8 (2,7)	9,5 (2,5)	9,3 (2,1)	9,5 (2,4)	9,6 (2,1)	9,0 (1,9)	9,0 (2,3)	9,3 (2,0)
Peso (kg)	90,5 (13,0)	89,5 (14,2)	86,3 (15,1)	87,0 (14,0)	85,9 (15,1)	85,7 (12,6)	84,5 (14,0)	90,5 (13,5)	87,2 (13,1)
IMC (kg/m ²)	31,7 (3,8)	31,5 (4,6)	30,4 (3,9)	29,7 (4,5)	30,7 (4,5)	31,2 (4,2)	30,9 (4,7)	31,0 (4,6)	30,9 (4,6)

Los datos son medias (DE) a menos que se indique de cualquier otra manera. *: Número de sujetos expuestos al tratamiento real. D&E: Dieta y ejercicio. FPG: Glucosa en plasma en ayunas. IMC: Índice de masa corporal.

Resultados

En el conjunto de análisis completo, la semaglutida ($\geq 0,2$ mg) redujo la HbA1c de manera dependiente de la dosis a partir de la referencia (Figura 1), y aumentó la posibilidad de alcanzar la HbA1c <7 % ($p < 0,05$ frente al placebo para dosis $\geq 0,2$ mg). Los resultados con respecto al cambio en HbA1c se muestran en la Figura 1. El cambio en HbA1c en la Figura 1 es a partir de la referencia en la semana 12. La Figura 2 muestra el cambio en HbA1c con el tiempo con los diferentes tratamientos. El tratamiento con semaglutida $\geq 0,8$ mg llevó numéricamente a más pacientes al objetivo que la liraglutida 1,8 mg (0,8 mg T 69 %, 0,8 mg T 73 %, 1,6 mg T 81 % frente a la liraglutida 1,8 mg 57 %). Los resultados (véase, por ejemplo, la Figura 1) muestran que el tratamiento con semaglutida 0,8 mg, 0,8 mg T o 1,6 mg T mejoró la reducción de HbA1c en comparación con el tratamiento con liraglutida 1,2 mg o 1,8 mg; además, el tratamiento con semaglutida 1,6 mg T fue estadísticamente superior al tratamiento con liraglutida 1,2 mg o 1,8 mg con respecto a la reducción de HbA1c (basado en las medias no ajustadas). La Figura 3 muestra el porcentaje y el número de sujetos que alcanzan los criterios AACE o ADA para el control glucémico con los diferentes tratamientos. Los resultados (véase la Figura 3) muestran que el tratamiento con semaglutida 0,8 mg, 0,8 mg T o 1,6 mg T mejoró el porcentaje y el número de sujetos que alcanzaron los criterios AACE o ADA para el control glucémico en comparación con el tratamiento con liraglutida 1,2 mg o 1,8 mg.

El peso corporal se redujo de manera dependiente de la dosis a partir de la referencia hasta 4,8 kg frente al placebo 1,2 kg ($p < 0,01$ para dosis $\geq 0,8$ mg). Las Figuras 4 y 5 muestran el cambio medio de peso corporal frente al tiempo y el cambio de peso corporal a partir de la referencia en la semana 12, respectivamente, con los diferentes tratamientos. Los resultados (véase, por ejemplo, la Figura 5) muestran que el tratamiento con semaglutida 0,8 mg, 0,8 mg T o 1,6 mg T aumentó la reducción del peso corporal en comparación con el tratamiento con liraglutida 1,2 mg o 1,8 mg. Además, los resultados (véase, por ejemplo, la Figura 5) muestran que el tratamiento con semaglutida 0,8 mg T o 1,6 mg T fue estadísticamente superior al tratamiento con liraglutida 1,8 mg con respecto a la reducción del peso corporal; y que el tratamiento con semaglutida de 0,8 mg, 0,8 mg de T o 1,6 mg T fue estadísticamente superior al de 1,2 mg de liraglutida con respecto a la reducción del peso corporal (basado en las medias no ajustadas).

No hubo informes de pancreatitis o cambios relacionados con el tratamiento en la calcitonina en sangre. La proporción de sujetos con náuseas y vómitos aumentó con la dosis, pero generalmente fueron leves o moderados y mejoraron con la titulación. Los retiros debidos a eventos adversos gastrointestinales fueron del 4,7 %-27,7 % para la semaglutida y del 2,2 %-10 % para la liraglutida. Unos pocos sujetos informaron hipoglucemia menor (semaglutida n = 5, liraglutida n = 3); sin hipoglucemia mayor. 7 sujetos informaron reacciones en el lugar de la inyección: semaglutida n = 2; liraglutida n = 5. Un sujeto (semaglutida 1,6 mg T) desarrolló anticuerpos antisemaglutida no neutralizantes de bajo título (sin reacción cruzada con el GLP-1 nativo).

Conclusión

Durante 12 semanas, la semaglutida redujo la HbA1c y el peso corporal de manera dependiente de la dosis. El efecto de la semaglutida 0,4 mg sobre el control glucémico y el peso corporal fue comparable al de la liraglutida 1,2 mg, mientras que la semaglutida $\geq 0,8$ mg trajo a más sujetos al objetivo y proporcionó una mejor pérdida de peso que la liraglutida 1,8 mg. No se identificaron problemas de seguridad con la semaglutida. El escalado de la dosis no fue un enfoque principal de este ensayo y se optimizará en futuros ensayos clínicos.

Métodos farmacológicos

Ensayo (I): Potencia In Vitro

El propósito de este ejemplo es probar la actividad, o potencia, de los agonistas del GLP-1 in vitro. Las potencias de los agonistas del GLP-1 pueden determinarse como se describió más abajo, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contiene membranas que expresan el receptor de GLP-1 humano.

Principio

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

Cultivo celular y preparación de las membranas

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

Las células a una confluencia aproximada del 80 % se lavan 2 veces con PBS y se colectan con Verseno (solución acuosa de la sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugan 5 min a 1000 rpm y se elimina el sobrenadante. Las etapas adicionales se hacen todas en hielo. El sedimento celular se homogeneiza mediante Ultrathurax durante 20-30 segundos en 10 ml de Tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH = 7,4), se centrifuga 15 minutos a 20 000 rpm y el sedimento se resuspende en 10 ml de Tampón 2 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 7,4). La suspensión se homogeneiza durante 20-30 segundos y se centrifuga durante 15 minutos a 20 000 rpm. La suspensión en Tampón 2, homogeneización y centrifugación se repite una vez y las membranas se resuspenden en Tampón 2. Se determina la concentración de proteínas y las membranas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

El ensayo se realiza en placas de 96 pocillos de ½ área, fondo plano (por ejemplo, Costar núm. de catálogo: 3693). El volumen final por pocillo es de 50 µl.

Soluciones y reactivos

Más abajo se proporcionan soluciones y reactivos ilustrativos.

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

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 MgCl₂, 6H₂O (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.

Estándar de cAMP (factor de dilución en el ensayo = 5): solución de cAMP: 5 µl de una solución madre de cAMP 5 mM + 495 µl de Tampón de AlphaScreen.

- 5 Las series de dilución adecuadas en el Tampón de AlphaScreen se preparan del estándar de cAMP así como también el agonista del GLP-1 para probar, por ejemplo, las siguientes ocho concentraciones del agonista del GLP-1: 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} y 10^{-14} M, y una serie de, por ejemplo, 10^{-6} a 3×10^{-11} de cAMP.

Membrana/Perlas aceptoras

- 10 Uso de membranas hGLP-1/ BHK 467-12A; 6 µg/pocillo que corresponde a 0,6 mg/ml (la cantidad de membranas usadas por pocillo puede variar)

"Sin membranas": Perlas aceptoras (15 µg/ml final) en tampón de AlphaScreen

- 15 "6 µg/pocillo de membranas": membranas + Perlas aceptoras (15 µg/ml final) en tampón de AlphaScreen

Añadir 10 µl de "Sin membranas" al estándar de cAMP (por pocillo en duplicados) y los controles positivos y negativos

- 20 Añadir 10 µl de "6 µg/pocillo de membranas" a GLP-1 y los agonistas del GLP-1 (por pocillo en duplicados/triplicados)

Control positivo: 10 µl de "Sin membranas" + 10 µl de Tampón de AlphaScreen

Control negativo: 10 µl de "Sin membranas" + 10 µl de solución madre de cAMP (50 µM)

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

Procedimiento

- 30 1. Hacer el Tampón de AlphaScreen.
2. Disolver y diluir el agonista del GLP-1/estándar de cAMP en el Tampón de AlphaScreen.
3. Fabricar la solución de Perlas Donantes e incubar 30 minutos a RT.
35 4. Añadir el cAMP/agonistas del GLP-1 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.
40 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.
45

Los valores de CE_{50} [pM] pueden calcularse mediante el uso del software Graph-Pad Prism (versión 5). Si es conveniente, la variación en veces en relación con GLP-1 puede calcularse como CE_{50} (GLP-1)/ CE_{50} (análogo) – 3693,2.

- 50 Ensayo (II): Vida media en Minicerdos

- El propósito de este estudio es determinar la prolongación in vivo de los agonistas del GLP-1 después de la administración i.v. a minicerdos, es decir la prolongación de su tiempo de acción. Esto se realiza en un estudio farmacocinético (PK), donde se determina la vida media terminal del agonista del GLP-1 en cuestión. Por vida media terminal se entiende generalmente el período de tiempo que se tarda en reducir a la mitad una determinada concentración en plasma, medida después de la fase de distribución inicial.
55

- En los estudios se usan minicerdos Göttingen machos obtenidos de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmose, Dinamarca), de aproximadamente 7-14 meses de edad y con un peso aproximado de 16-35 kg. Los minicerdos se alojan individualmente y se alimentan 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 implantan dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis o cranial en cada animal. A los animales se les permite una recuperación de 1 semana después de la cirugía y después se usan para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de lavado adecuado entre las dosificaciones.
60
65

Los animales se mantienen en ayunas durante aproximadamente 18 h antes de la dosificación y durante al menos 4 h después de la dosificación, pero tienen acceso ad libitum al agua durante todo el período.

El agonista del GLP-1 se disuelve en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración de usualmente 20-60 nmol/ml. Se administran inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a usualmente 1-2 nmol/kg, por ejemplo 0,033 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter, y se toman 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 recolectan en tampón de EDTA (8 mM) y después se centrifugan a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos. El plasma se pipetea en tubos micrónicos sobre hielo seco y se mantiene a -20 °C hasta que se analiza la concentración plasmática del compuesto GLP-1 respectivo mediante el uso de ELISA o un ensayo basado en anticuerpo similar o LC-MS. Los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo se analizan mediante un modelo no compartimental en WinNonlin v. 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos) y se determinan las vidas medias terminales resultantes (media armónica).

Ensayo (III): Efecto sobre la Glucosa en Sangre y el Peso Corporal

El propósito del estudio es verificar el efecto de los agonistas del GLP-1 sobre la glucosa en sangre (BG) y el peso corporal (BW) en un ambiente diabético. Los agonistas del GLP-1 pueden probarse en un estudio de respuesta a dosis en un modelo de ratón obeso, diabético (ratones db/db) como se describió más abajo.

Cincuenta ratones db/db (Taconic, Dinamarca), alimentados desde el nacimiento con la dieta NIH31 (NIH 31M Rodent Diet, comercialmente disponible de Taconic Farms, Inc., Estados Unidos, véase www.taconic.com), se inscriben para el estudio en el edad de 7-9 semanas. Los ratones tienen acceso libre a comida estándar (por ejemplo, Altromin 1324, Brogaarden, Gentofte, Dinamarca) y agua corriente y se mantienen a 24 °C. Después de 1-2 semanas de aclimatación, la glucosa en sangre de referencia se evalúa dos veces por dos días consecutivos (es decir a las 9 am). Los 8 ratones con los valores más bajos de glucosa en sangre pueden excluirse de los experimentos. En base a la media de los valores de glucosa en sangre, pueden seleccionarse 42 ratones para experimentación adicional y se asignan a 7 grupos (n=6) con niveles de glucosa concordantes. Los ratones pueden usarse en experimentos con una duración de 5 días hasta 4 veces. Después del último experimento, los ratones se sacrifican.

Los siete grupos reciben el tratamiento de la siguiente manera:

- 1: Vehículo, subcutáneo
- 2: agonista del GLP-1, 0,3 nmol/kg, subcutáneo
- 3: agonista del GLP-1, 1,0 nmol/kg, subcutáneo
- 4: agonista del GLP-1, 3,0 nmol/kg, subcutáneo
- 5: agonista del GLP-1, 10 nmol/kg, subcutáneo
- 6: agonista del GLP-1, 30 nmol/kg, subcutáneo
- 7: agonista del GLP-1, 100 nmol/kg, subcutáneo

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

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

El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evalúa en el tiempo de -½h (8.30 a.m.), donde después los ratones se pesan. El agonista del GLP-1 se dosifica a aproximadamente las 9 am (tiempo 0). El día de la dosificación, la glucosa en sangre se evalúa por ejemplo en los tiempos 1, 2, 4 y 8 h (10 am, 11 am, 1 pm y 5 pm).

En los días siguientes, se evalúa la glucosa en sangre por ejemplo a los tiempos 24, 48, 72 y 96 h después de la dosificación (es decir, a las 9 a.m. del día 2, 3, 4, 5). En cada día, los ratones se pesan después del muestreo de glucosa en sangre.

Los ratones se pesan individualmente en una balanza digital.

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

muestras se mantuvieron a 4 °C durante un máximo de 24 h.

La DE₅₀ es la dosis que da lugar al efecto semimáximo en nmol/kg. Este valor se calcula sobre la base de la capacidad de los agonistas del GLP-1 para bajar el peso corporal así como también la capacidad para bajar la glucosa en sangre, como se explica más abajo.

La DE₅₀ para el peso corporal se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre delta BW 24 horas después de la administración subcutánea del agonista del GLP-1. Por ejemplo, si la disminución máxima del peso corporal después de 24 horas es 4,0 g, entonces la DE₅₀ del peso corporal es la dosis en nmol/kg que da lugar a una disminución del peso corporal después de 24 horas de 2,0 g. Esta dosis (DE₅₀ del peso corporal) puede leerse a partir de la curva de respuesta a dosis.

La DE₅₀ para la glucosa en sangre se calcula como la dosis que da lugar al efecto semimáximo sobre AUC delta BG 8 horas después de la administración subcutánea del agonista del GLP-1.

El valor de la DE₅₀ sólo puede calcularse si existe una relación sigmoideal de respuesta a dosis apropiada con una clara definición de la respuesta máxima. Por lo tanto, si este no fuera el caso el agonista del GLP-1 en cuestión se vuelve a probar a un intervalo de dosis diferente hasta que se obtenga la relación sigmoideal de respuesta a dosis.

Ensayo (IV): Efecto sobre la Ingestión de Alimentos

El propósito de este experimento es investigar el efecto de los agonistas del GLP-1 sobre la ingestión de alimentos en cerdos. Esto se hace en un estudio farmacodinámico (PD) como se describe más abajo, en el cual la ingestión de alimentos se mide 1, 2, 3 y 4 días después de la administración de una dosis única del agonista del GLP-1, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo.

Se usaron cerdos hembras Landrace Yorkshire Duroc (LYD), de aproximadamente 3 meses de edad, con un peso de aproximadamente 30-35 kg (n=3-4 por grupo). Los animales se alojaron en un grupo por 1-2 semanas durante la aclimatación a las instalaciones de los animales. Durante el período experimental, los animales se colocaron en corrales individuales desde el lunes por la mañana hasta el viernes por la tarde para la medición de la ingestión de alimentos individuales. Los animales se alimentaron ad libitum con forraje de cerdo (Svinefoder, Antonio) en todos los momentos tanto durante el período de aclimatación y el experimental. La ingestión de alimentos se monitoreó en línea registrando el peso del forraje cada 15 minutos. El sistema usado es Mpigwin (Ellegaard Systems, Faaborg, Dinamarca).

Los agonistas del GLP-1 se disolvieron en un tampón fosfato (fosfato 50 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 8) por ejemplo a concentraciones de 12, 40, 120, 400 o 1200 nmol/ml que corresponden a dosis de 0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg. El tampón fosfato sirvió como vehículo. Los animales se dosificaron con una sola dosis subcutánea del agonista del GLP-1 o vehículo (volumen de dosis de 0,025 ml/kg) en la mañana del día 1 y la ingestión de alimentos se midió por 4 días después de la dosificación. El último día de cada estudio, 4 días después de la dosificación, se tomó una muestra de sangre para medir la exposición en plasma del agonista del GLP-1 del corazón en animales anestesiados. Después los animales se sacrificaron con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital. El contenido en plasma del agonista del GLP-1 se analizó mediante el uso de un ensayo ELISA o un ensayo similar basado en anticuerpos.

La ingestión de alimentos se calcula como la media $\pm$ SEM de la ingestión de alimentos en 24 h en los 4 días. Las comparaciones estadísticas de la ingestión de alimentos a las 24 horas en el grupo vehículo frente al del agonista del GLP-1 en los 4 días se realizaron mediante el uso de un ANOVA de una o dos vías con mediciones repetidas, seguido por la prueba posterior de Bonferroni.

Ensayo (V): Estabilidad contra la Degradación por Enzimas Intestinales

El propósito de este ejemplo es probar la estabilidad contra la degradación por enzimas intestinales. El GLP-1(7-37) puede usarse en el ensayo como un compuesto comparativo. Las actividades proteolíticas más fuertes en el intestino son de origen pancreático e incluyen las serina endopeptidasas, tripsina, quimotripsina y elastasa, así como también varios tipos de carboxipeptidasas. Se desarrolló un ensayo con extracto de intestino delgado de ratas y se usó como se describe más abajo.

Extractos de intestino delgado de rata

Los intestinos delgados se preparan a partir de ratas y se purgan con 8 ml de NaCl 150 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4. Las soluciones se centrifugan durante 15 minutos a 4600 rpm en una centrifuga Heraeus Multifuge 3 SR con un rotor 75006445. Los sobrenadantes se eliminan y se filtran a través de una membrana de PVDF Millipore Millex GV de 0,22 μ m. Los filtrados de varios animales se agrupan para promediar las diferencias individuales.

El contenido de proteína de los extractos obtenidos se determina mediante el ensayo de Bradford (véase, por ejemplo, Analytical Biochemistry (1976), vol. 72, p. 248-254, y Analytical Biochemistry (1996), vol. 236 p. 302-308).

Ensayo de degradación

Se incuban 2,5 nmoles de los agonistas del GLP-1 a probar con el extracto intestinal en un volumen de 250 µl a 37 °C durante un período de una hora. Las muestras intestinales se evalúan en presencia de Hepes 20 mM a pH 7,4. La concentración del extracto intestinal se titula en experimentos piloto para que la vida media ($t_{1/2}$) del GLP-1(7-37) esté en el intervalo de 10-20 minutos. El extracto de intestino delgado se usa a una concentración de 1,4 µg / ml. Todos los componentes excepto el extracto intestinal se mezclan y se precalientan durante diez minutos a 37 °C. Inmediatamente después de la adición del extracto intestinal, se toma una muestra de 50 µl y se mezcla con el mismo volumen de ácido trifluoroacético (TFA) al 1%. Se toman muestras adicionales en consecuencia después de 15, 30 y 60 minutos.

Análisis de las muestras

Análisis UPLC: 10 µl de las muestras se analizan por UPLC mediante el uso de un sistema Waters Acquity con una columna BEH C18 de 1,7 µm 2,1 x 50 mm y un gradiente de 30 a 65 % de TFA al 0,1 % y TFA al 0,07 % en acetonitrilo durante 5 minutos a un régimen de flujo de 0,6 ml/ in. Después de la sustracción de la referencia, se determinan las integrales máximas de los compuestos intactos en el cromatograma de HPLC registrado a una longitud de onda de 214 nm.

Análisis MALDI-TOF: 1 µl de cada muestra se transfiere a un objetivo Bruker/Eppendorf PAC HCCA 384 MALDI. El análisis se realiza con un espectrómetro de masas de desorción e ionización asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) Bruker Autoflex mediante el uso del método predefinido "PAC_measure" con un intervalo de detección extendido de 500 a 5000 Da y el método de calibración predefinido "PAC_calibrate".

Análisis de datos: Las integrales de pico de los cromatogramas de HPLC se trazan frente al tiempo. La vida media del compuesto respectivo se calcula por ajuste de los datos mediante el uso del software SigmaPlot 9.0 y una ecuación para una disminución exponencial de 2 parámetros. Para cada agonista del GLP-1 probado, la vida media relativa ($T_{1/2}$ relativa) se calcula como la vida media ($T_{1/2}$) del compuesto en cuestión, dividida por la vida media ($T_{1/2}$) del GLP-1(7-37), determinado de la misma manera.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> USO DE PÉPTIDOS GLP-1 DE ACCIÓN PROLONGADA

<130> 8545.204-WO

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Agonista del GLP-1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Este residuo es H-His

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (39)..(39)
 <223> Este residuo es Ser-NH2

10 <400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

15 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

25 <210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Agonista del GLP-1

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Aib

<400> 3

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

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

55 <210> 4
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (60)..(60)
 <223> genéticamente fusionado a la albúmina humana

<400> 4

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

5

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

10

Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala
35 40 45

15

Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
50 55 60

<210> 5

20

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Agonista del GLP-1

<220>

30

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)

<223> L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, Nalfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina

<220>

35

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico ácido (1- aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico,

40

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (10)..(10)

<223> Val o Leu

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

<223> Ser, Lys o Arg

50

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (13)..(13)

<223> Tyr o Gln

55

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (14)..(14)

<223> Leu o Met

60

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (16)..(16)

<223> Gly, Glu o Aib

	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (17)..(17)
5	<223> Gln, Glu, Lys o Arg
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (19)..(19)
10	<223> Ala o Val
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (20)..(20)
15	<223> Lys, Glu o Arg
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (21)..(21)
20	<223> Glu o Leu
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (24)..(24)
25	<223> Ala, Glu o Arg
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (27)..(27)
30	<223> Val o Lys
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (28)..(28)
35	<223> Lys, Glu, Asn o Arg
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (29)..(29)
40	<223> Gly o Aib
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (30)..(30)
45	<223> Arg, Gly o Lys
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (31)..(31)
50	<223> Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (32)..(32)
55	<223> Lys, Ser, amida o ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (33)..(33)
60	<223> Ser, Lys, amida o ausente; siempre y cuando el residuo está ausente si alguno de los residuos anteriores está ausente
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (34)..(34)
65	<223> Gly, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (35)..(35)
 5 <223> Ala, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 <222> (36)..(36)
 <223> Pro, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (37)..(37)
 <223> Pro, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 20 <222> (38)..(38)
 <223> Pro, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser, amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes
 30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (40)..(40)
 35 <223> amida o ausente, siempre y cuando este residuo esté ausente si alguno de los residuos anteriores están ausentes

 <400> 5

 40 Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 45 20 25 30

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40
 50
 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> agonista del GLP-1
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 60 <222> (1)..(1)
 <223> L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, -hidroxi-histidina, homohistidina, Nalfa-acetil-histidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina

 <220>
 65 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)
 <223> Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1- aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexilo) arboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o

5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> Ser, Lys o Arg

10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> Gly, Glu o Aib

15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (17)..(17)
 <223> Gln, Glu, Lys o Arg

20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys, Glu o Arg

25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (24)..(24)
 <223> Ala, Glu o Arg

30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (28)..(28)
 <223> Lys, Glu o Arg

35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Gly o Aib

40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (30)..(30)
 <223> Arg o Lys

45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Gly, Ala, Glu o Lys

50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (32)..(32)
 <223> Lys, amida o ausente

55 <400> 6

Xaa	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Xaa	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1				5					10				15		
Xaa	Ala	Ala	Xaa	Glu	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
60			20				25						30		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende el agonista del GLP-1 semaglutida y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para usar en la prevención o el tratamiento de la obesidad, en donde dicho uso comprende la administración de dicho agonista del GLP-1 en una cantidad de al menos 0,7 mg por semana; y dicha composición (i) comprende un agente isotónico, (ii) está en la forma de una formulación acuosa que comprende al menos 80 % p/p de agua, o (iii) está en la forma de una formulación acuosa con pH entre 3 y 10.
- 10 2. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición consiste en el agonista del GLP-1 semaglutida y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
3. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra una vez por semana o con menos frecuencia.
- 15 4. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra una vez por semana.
5. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 0,8 mg, al menos 0,9 mg, o al menos 1,0 mg.
- 25 7. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 1,1 mg, al menos 1,2 mg o al menos 1,3 mg.
- 30 8. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra en una cantidad por semana de al menos 1,4 mg, al menos 1,5 mg o al menos 1,6 mg.
9. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agonista del GLP-1 se administra por administración parenteral, tal como inyección subcutánea (sc).
- 35 10. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho uso reduce el peso corporal.
11. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH de dicha formulación acuosa es a partir de 7,0 hasta 9,5.
- 40 12. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición es una solución.
- 45 13. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición está en la forma de una formulación acuosa que comprende al menos 80 % p/p de agua.
14. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en solventes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes quelantes, estabilizadores.
- 50 15. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende un agente isotónico.

55

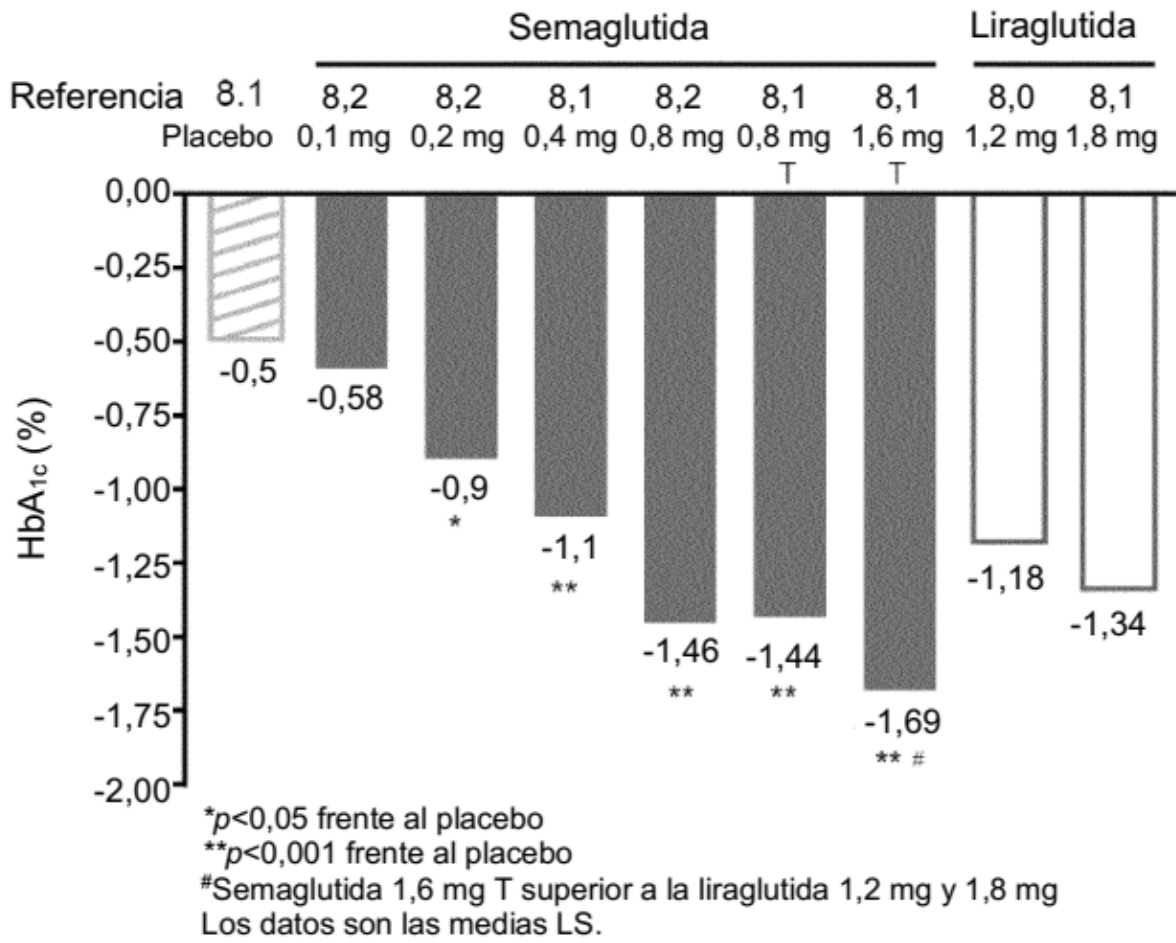


Figura 1

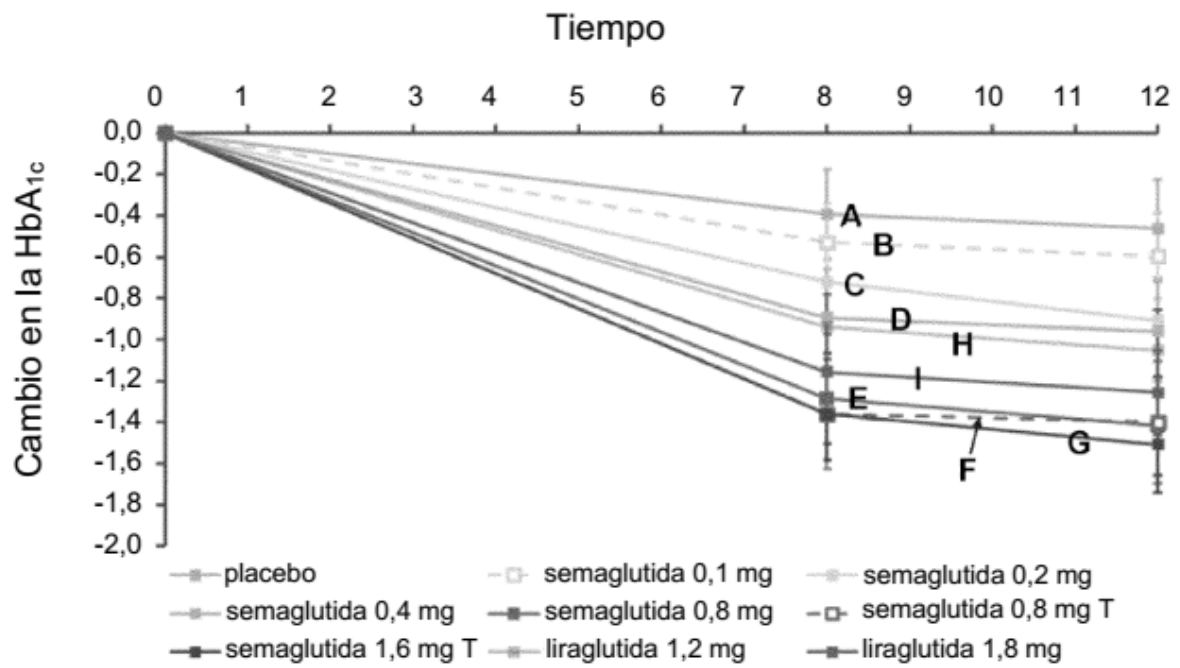


Figura 2

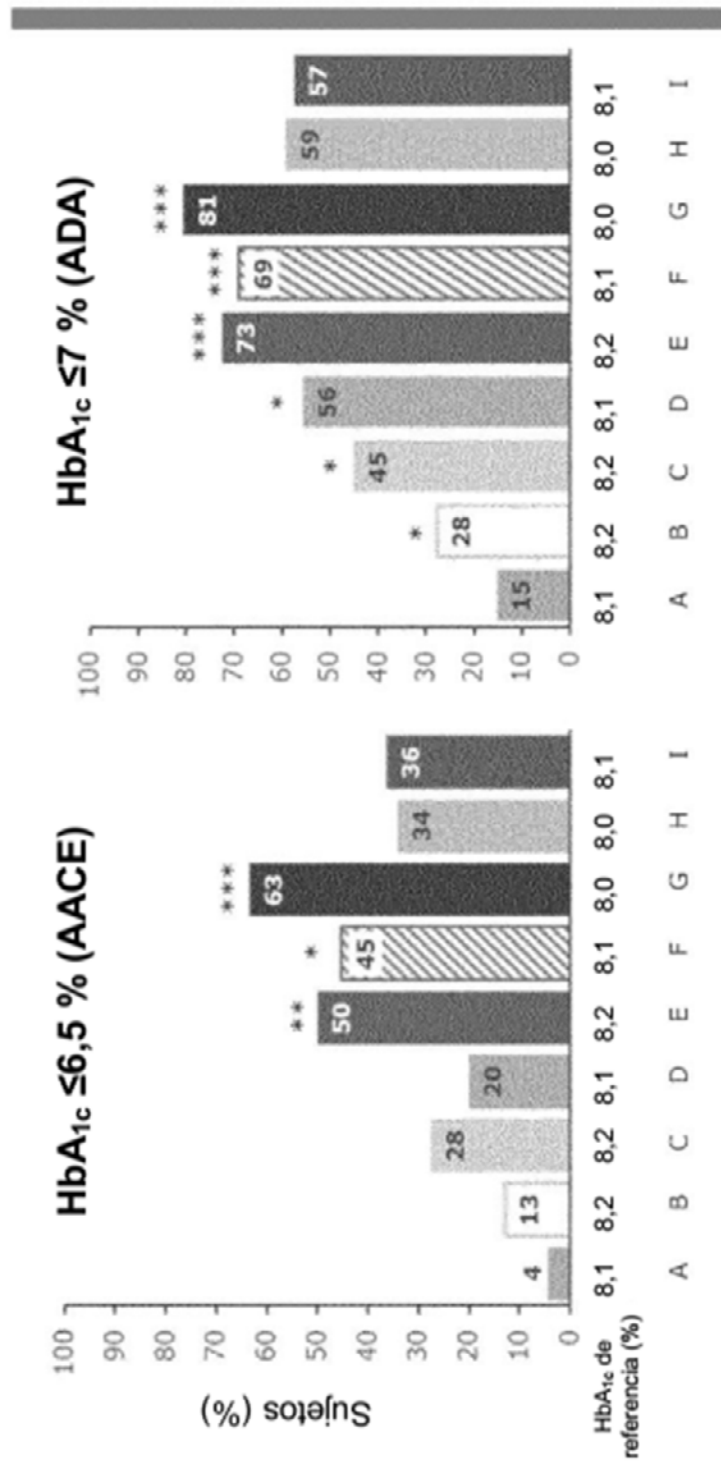


Figura 3

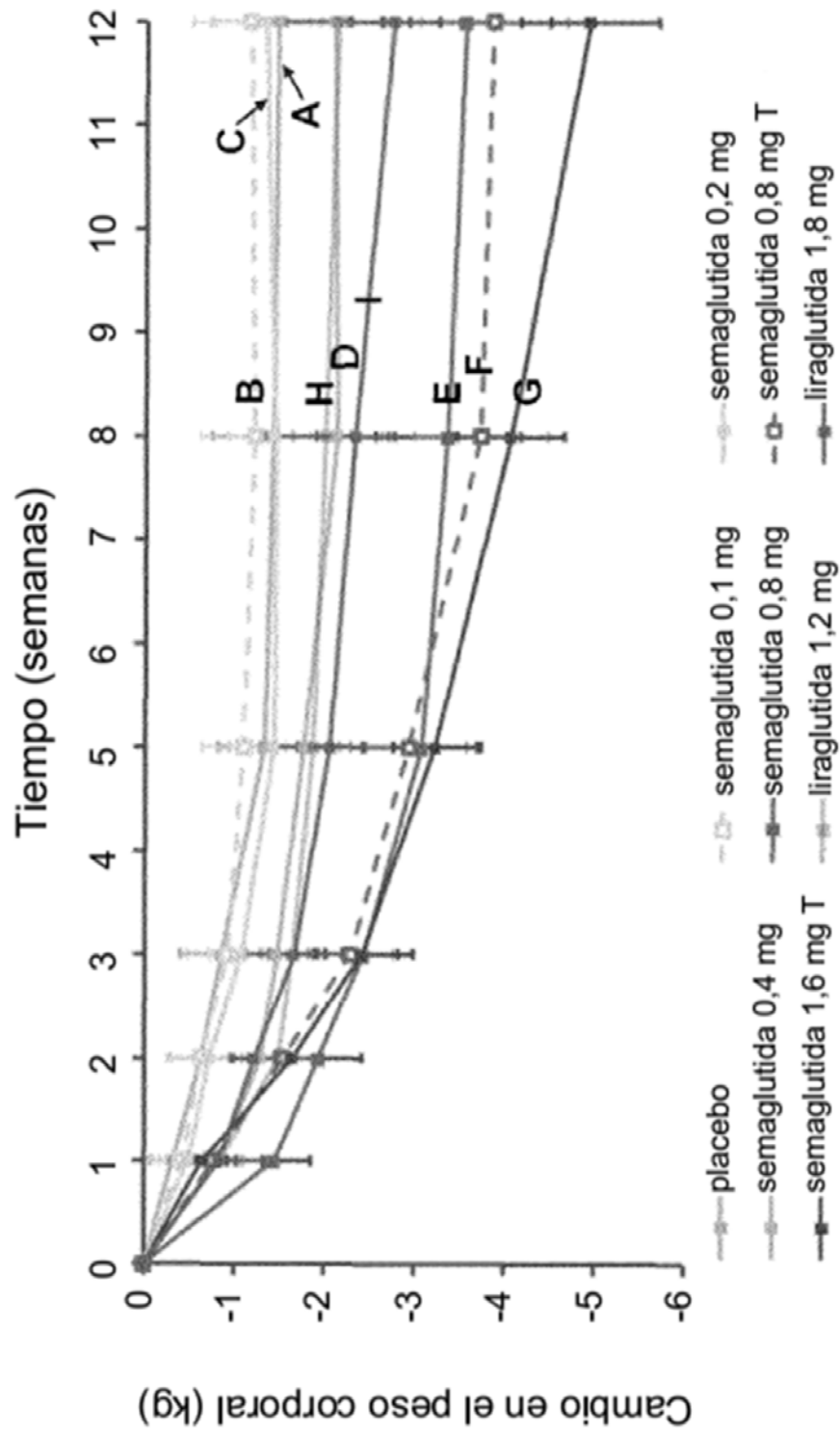


Figura 4

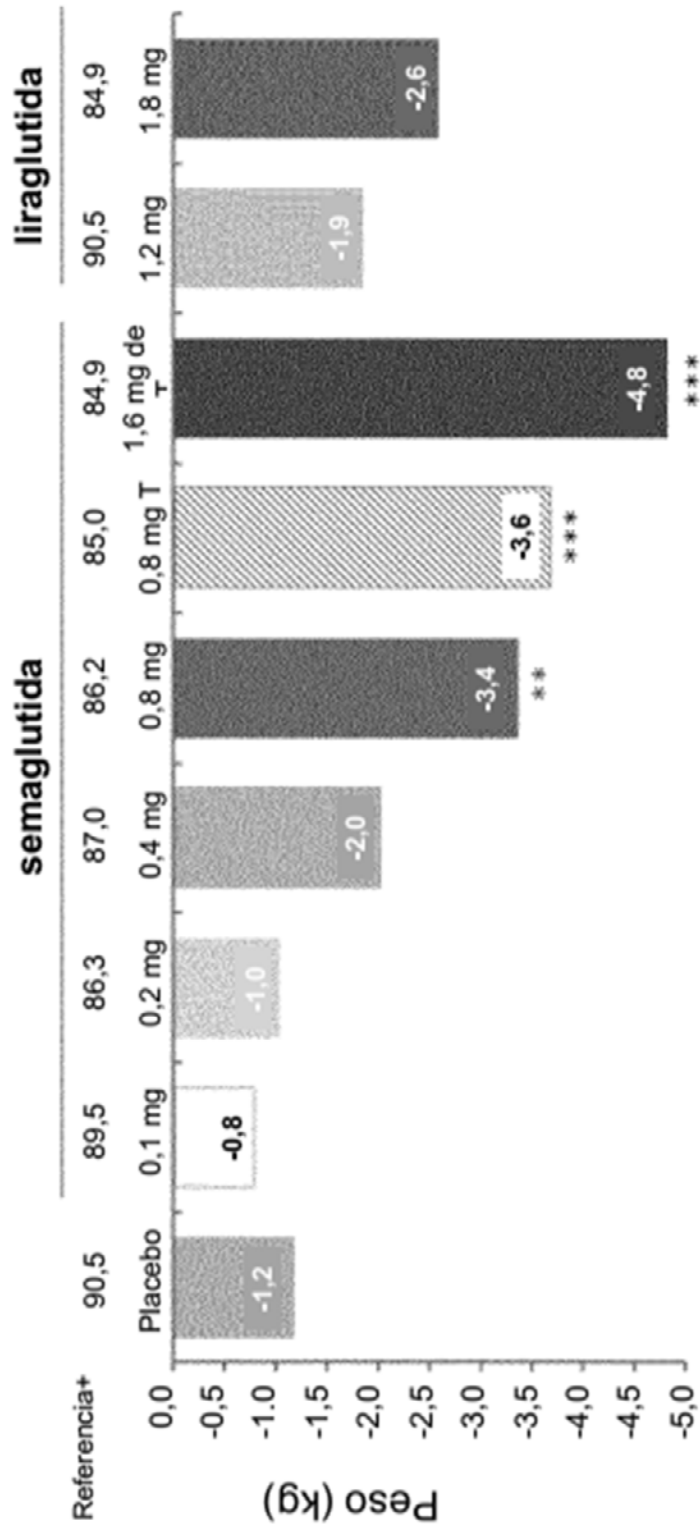


Figura 5