

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 326**

51 Int. Cl.:

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: **09.10.2015 PCT/EP2015/073372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015 E 15778311 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3204408**

54 Título: **Coagonistas estables del receptor de GLP-1/glucagón basados en GLP-1**

30 Prioridad:

10.10.2014 EP 14188421

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

11.02.2021

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

REEDTZ-RUNGE, STEFFEN;

SENSFUSS, ULRICH;

KRUSE, THOMAS;

SPETZLER, JANE;

THØGERSEN, HENNING;

WENZEL TORNØE, CHRISTIAN y

LAU, JESPER F.

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 2 805 326 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

Coagonistas estables del receptor de GLP-1/glucagón basados en GLP-1

- 5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de GLP-1 que son coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón, composiciones de los mismos y su uso en medicina.

Antecedentes de la invención

- 10 Numerosas hormonas peptídicas gastrointestinales están implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética (por ejemplo, CCK, GLP-1, PYY, grelina). Recientemente, se demostró que también Oxintomodulina (Oxm), un producto del gen de proglucagón en las células L intestinales, tiene propiedades anorexigénicas tanto en roedores como en seres humanos. Un estudio clínico de cuatro semanas de duración en seres humanos obesos demostró que la administración subcutánea repetida de Oxm redujo la ingesta de alimentos y provocó una pérdida de peso corporal significativa. Dado que aún no se ha encontrado un receptor de Oxm específico, se ha sugerido que muchos de los efectos fisiológicos son mediados a través de la activación del receptor de GLP-1 y glucagón. De hecho, Oxm se une y activa tanto los receptores de GLP-1 como de glucagón, aunque con menor afinidad y potencia que los ligandos afines. Varios artículos recientes han demostrado el poder del direccionamiento simultáneo del receptor de GLP-1/glucagón mediante la construcción de agonistas dobles y la comparación del efecto de la reducción del peso en ratones DIO y modelos de ratones inactivados. El tratamiento con un coagonista equilibrado del receptor de GLP-1/glucagón dio como resultado una reducción robusta en el peso corporal y la masa grasa, que excede a la de un agonista del receptor de GLP-1 puro, y con un control de glucosa comparable al de un agonista del receptor de GLP-1. Las mejoras en los parámetros metabólicos en plasma que incluyen insulina, leptina y adiponectina fueron más pronunciadas tras el tratamiento con un coagonista del receptor de GLP-1/glucagón que con un agonista del receptor de GLP-1 puro. Además, el tratamiento con coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón aumentó la oxidación de ácidos grasos y redujo la esteatosis hepática en ratones DIO. En ratones inactivados para el receptor de GLP-1 o glucagón, los coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón demostraron un efecto reducido, pero aún significativo, sobre la pérdida de peso corporal en comparación con los animales de tipo silvestre, lo que respalda la hipótesis de que la activación simultánea de los receptores de GLP-1 y glucagón da como resultado una pérdida de peso superior.

- El documento WO2009030738 (NOVO NORDISK A/S) describe análogos de GLP-1 (7-37) que pueden tener Des-His en la posición 7, Aib en la posición 8 y Glu en la posición 9. Tales análogos de GLP-1 pueden derivatizarse con un residuo de unión a albúmina.

- 35 El documento WO2013041678 (NOVO NORDISK A/S) describe péptidos derivados de glucagón con un resto lipófilo y grupos cargados negativamente.

- 40 El documento WO2008019143 (AMYLIN PHARMACEUTICALS INC y LILLY CO ELI) describe análogos de GLP-1 con sustituyentes lipófilos unidos, incluidos alquilos y derivados de los mismos. La posición 7 puede ser Des-His y la posición 8 puede ser Aib.

- 45 El documento WO2011117415 (NOVO NORDISK A/S) describe coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón derivados del glucagón. Algunos de estos coagonistas podrían tener Des-His en la posición 7 y tener un sustituyente de resto lipófilo.

- El documento WO2009030771 (NOVO NORDISK A/S) describe derivados de GLP-1 (7-35) con Des-His en la posición 7 y alquilos unidos.

- 50 El documento WO2011160633 (ZEALAND PHARMA) describe análogos de GLP-1 con His en la posición 9 y el documento WO2011088837 (ZEALAND PHARMA) describe derivados de GLP-1 con His en la posición 9.

- La biodisponibilidad y la farmacocinética de un péptido de autoasociación pueden verse influenciadas por el tamaño del agregado y la facilidad de interrupción de las interacciones intermoleculares no covalentes en el sitio subcutáneo (Clodfelter DK y otros, 1998). Se ha descrito la estructura y función de GLP-1 y los análogos de GLP-1 se han sugerido para aplicaciones terapéuticas (Hongxiang H y otros 2005), incluido el direccionamiento de la familia de receptores de glucagón para la terapia de la diabetes y la obesidad (Young MC y otros, 2012). Se ha descrito la estructura y función del receptor del péptido-1 similar a glucagón y sus ligandos (Donnelly D 2012).

- 60 El documento WO0246227 (LILLY CO ELI) describe compuestos similares a glucagón-1 fusionados a proteínas que tienen el efecto de extender la vida media in vivo de los péptidos y la aplicación de estas proteínas de fusión en diabetes mellitus no dependiente de insulina, así como también una variedad de otras afecciones.

- 65 El documento WO2015124612 (NOVO NORDISK A/S) describe análogos de glucagón que comprenden una fórmula específica y sin un resto lipófilo o restos cargados negativamente.

En la presente descripción se describen productos intermedios en la forma de análogos de GLP-1 como se definen en la presente descripción, o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Curso de tiempo sigmoidal teórico para la emisión de fluorescencia de ThT durante la formación de fibrillas amiloides.

Descripción

La presente invención proporciona nuevos derivados de GLP-1 que comprenden sustituciones de aminoácidos y un sustituyente con restos cargados negativamente cuyos derivados de GLP-1 son coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón. La expresión “coagonista del receptor de GLP-1/glucagón” como se usa en la presente descripción se refiere a un agonista que activa tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón. Específicamente, los derivados de GLP-1 de la invención comprenden sustituciones de aminoácidos a desaminohistidina en la posición 7 e histidina en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos de los derivados de GLP-1 que además comprenden un sustituyente con al menos dos cargas negativas. En algunas modalidades, las referencias a posiciones de aminoácidos en el derivado de GLP-1 como se usa en la presente descripción son relativas a GLP-1(7-37) humano en donde la histidina N-terminal se define como la posición 7.

En algunas modalidades el derivado de GLP-1 de la presente invención activa mejor el receptor de GLP-1 que el receptor de glucagón, es decir, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 de más de 1. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 de la presente invención se une mejor al receptor de GLP-1 que al receptor de glucagón, es decir, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de IC_{50} sobre el receptor de glucagón e IC_{50} sobre el receptor de GLP-1 de más de 1. Los ensayos de receptor descritos en la presente descripción pueden usarse para evaluar tales relaciones.

Los inventores han descubierto que los derivados de GLP-1 de la presente invención pueden tener una estabilidad física mejorada y una estabilidad química mejorada, al tiempo que conservan una solubilidad acuosa, potencia del receptor y unión al receptor adecuados. En algunas modalidades, los derivados de GLP-1 tienen una estabilidad física mejorada (por ejemplo, los derivados de GLP-1 no muestran fibrilación retardada o ninguna en un ensayo usado para evaluar la estabilidad física – ejemplos de tales ensayos se describen en la presente descripción). También, o alternativamente, en algunas modalidades, los derivados de GLP-1 tienen una solubilidad acuosa adecuada en un intervalo de pH aceptable para una composición farmacéutica, tal como a pH neutro o pH ligeramente básico. Además, o alternativamente, en algunas modalidades, los derivados de GLP-1 tienen una estabilidad química mejorada, por ejemplo, la degradación química de los derivados de GLP-1 se reduce, por ejemplo, en una composición líquida, tal como una composición farmacéutica. Además, o alternativamente, en algunas modalidades, los derivados de GLP-1 tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, es decir, tienen una vida media prolongada *in vivo*, por ejemplo, en comparación con glucagón humano y/o GLP-1 humano. También, o alternativamente, en algunas modalidades, los derivados de GLP-1 inducen una reducción significativa en el peso corporal después de la administración s.c. El ensayo (I) y (II) como se describe en la presente descripción puede usarse para medir la actividad y la afinidad, respectivamente, de los derivados de GLP-1 de la invención sobre los receptores de glucagón y GLP-1. La solubilidad de los derivados de GLP-1 de la invención a diferentes valores de pH puede medirse como se describe en la presente descripción, ver por ejemplo, la sección de Propiedades Funcionales. La estabilidad física de los derivados de GLP-1 de la presente invención puede medirse mediante el método como se describe en el Ensayo (III) en la presente descripción. La estabilidad química de los derivados de GLP-1 de la invención puede medirse como se describe en Ensayo (V) en la presente descripción. La vida media de los derivados de GLP-1 puede determinarse en un estudio farmacocinético en especies, tales como ratones (por ejemplo, mediante el uso del método descrito en el Ensayo (IV) en la presente descripción), ratas o en minicerdos. La reducción del peso corporal provocada por los derivados de GLP-1 de la invención puede medirse mediante la administración a ratones DIO del derivado de GLP-1 de la invención y comparando sus efectos sobre el peso corporal con la administración del vehículo solo.

Péptidos y análogos de GLP-1

El término “péptido GLP-1”, como se usa en la presente descripción, se refiere a GLP-1 humano, cuya secuencia se incluye en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 1 o un análogo de la misma. El péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 también puede denominarse simplemente “GLP-1” en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, los términos “GLP-1 humano” y “GLP-1” se refieren a HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 1). 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.

5 En otras palabras, un análogo de GLP-1 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.

10 El término "análogo de GLP-1" como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido o un compuesto, que es una variante de GLP-1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de Fórmula I en la presente descripción es un ejemplo de un análogo de GLP-1. Los términos "análogo de GLP-1" y "análogo" pueden usarse indistintamente en la presente descripción. El término "polipéptido" como se usa en la presente descripción, por ejemplo, en relación con el derivado de GLP-1 tal como "polipéptido del derivado de GLP-1", puede referirse al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de Fórmula I como se define en la presente descripción.

15 Los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención pueden describirse como referencia a i) el número del residuo aminoacídico en GLP-1 (SEQ ID NO: 1) que corresponde al residuo aminoacídico que se modifica (es decir, la posición correspondiente en GLP-1 (SEQ ID NO: 1)), y a ii) la real modificación. Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura adecuada de los análogos de GLP-1.

20 El análogo de GLP-1 es un péptido GLP-1 con una serie de modificaciones de residuos aminoacídicos en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). Estas modificaciones pueden ser una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. Por ejemplo, "[Imp7,His9]-GLP-1" o "péptido [Imp7,His9]-GLP-1(7-37)" designa GLP-1 (SEQ ID NO: 1), en donde el aminoácido en la posición 7 se ha sustituido con Imp y el aminoácido en la posición 9 se ha sustituido con His. Del mismo modo, "péptido [Imp7,His9,des36-37]-GLP-1(7-35)" o "[Imp7,His9,des36-37]-GLP-1" designa GLP-1 (SEQ ID NO: 1), en donde el aminoácido en la posición 7 se ha sustituido con Imp, y el aminoácido en la posición 9 se ha sustituido con His, y los aminoácidos en las posiciones 36 y 37 se han delecionado.

30 Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, en comparación con la SEQ ID NO: 1. En una modalidad particular, el análogo "consiste en" o "tiene" los cambios especificados.

35 Como es evidente a partir de los ejemplos anteriores, los residuos aminoacídicos pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son completamente equivalentes. En algunas modalidades, los análogos de GLP-1 y los derivados de GLP-1 se dibujan mediante el uso de códigos estándar de una letra o tres letras de acuerdo con la nomenclatura IUPAC-IUB.

40 Las expresiones "posición" o "posición correspondiente" pueden usarse para caracterizar el sitio de cambio en una secuencia de aminoácidos de GLP-1 en referencia al GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). La posición, así como también el número de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo, mediante simple escritura e inspección visual.

45 El término "péptido", como se usa, por ejemplo, en el contexto de los análogos de GLP-1 de los derivados de la invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados mediante enlaces amida (o peptídicos). Los derivados de GLP-1 de la invención comprenden al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados a través de enlaces peptídicos. En modalidades particulares adicionales, el péptido a) comprende o b) consiste en i) 28, ii) 29, iii) 30, o iv) 31. En aún otra modalidad particular, el péptido consiste en aminoácidos interconectados a través de enlaces peptídicos.

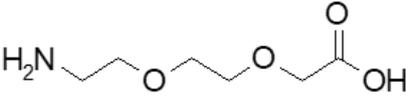
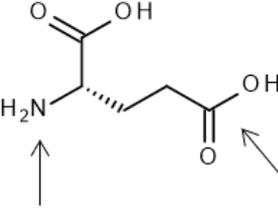
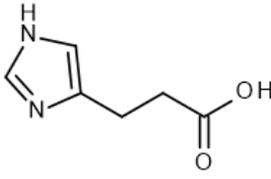
50 Los aminoácidos son moléculas que comprenden un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. El término "aminoácido", como se usa en la presente descripción, incluye aminoácidos codificados (entre ellos, los 20 aminoácidos estándar), así como también aminoácidos no codificados. Los aminoácidos codificados son aquellos que están codificados por el código genético (IUPAC Tabla 1 sección 3AA-1, www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html#AA1). Los aminoácidos no codificados tampoco se encuentran en péptidos y/o proteínas nativas (por ejemplo, humanas) o no son producidos por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haberse sometido a modificación postraduccional). Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no codificados son Aib (ácido alfa-aminoisobutírico), des-amino-histidina (ácido 3-(imidazol-4-il)propiónico, nombre alternativo ácido imidazopropiónico, abreviado Imp), así como también los isómeros D de los aminoácidos codificados. En la presente descripción, Imp se define como un aminoácido aunque no comprende un grupo amino.

60 En la presente descripción, debe entenderse que todos los aminoácidos del péptido (por ejemplo, el análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1) para los cuales no se indica el isómero óptico, significan el isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

65 El derivado de GLP-1 puede comprender un total de hasta 15 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, una o más adiciones, una o más deleciones y/o una o más sustituciones) en el polipéptido en comparación con el GLP-1

humano (SEQ ID NO: 1). El derivado de GLP-1 puede comprender un polipéptido que comprende 3-15 modificaciones de residuos aminoacídicos, tales como sustituciones, adiciones o deleciones, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). El derivado de GLP-1 puede comprender un polipéptido que comprende hasta 14, tal como hasta 13 o hasta 12, modificaciones de residuos aminoacídicos, tales como sustituciones, adiciones o deleciones, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). El derivado de GLP-1 puede comprender un polipéptido que comprende hasta 11, tal como hasta 10 o hasta 9, modificaciones de residuos aminoacídicos, tales como sustituciones, adiciones o deleciones, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). El derivado de GLP-1 puede comprender un polipéptido que comprende hasta 8, tal como hasta 7 o hasta 6, modificaciones de residuos aminoacídicos, tales como sustituciones, adiciones o deleciones, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1). El derivado de GLP-1 puede comprender un polipéptido que comprende hasta 5, tal como hasta 4 o hasta 3, modificaciones de residuos aminoacídicos, tales como sustituciones, adiciones o deleciones, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1).

Las abreviaturas usadas en el presente contexto tienen lo significados siguientes:

Código de tres letras	Código de una letra	Descripción
Acb	n/a*	Ácido 1-aminociclobutanocarboxílico
Acpr	n/a	Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico
Ado	n/a	
Aib	n/a	Ácido 2-aminoisobutírico
Ala	A	Alanina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido aspártico
Arg	R	Arginina
Cit	n/a	Citrulina
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutámico
γGlu	n/a	 en donde el grupo alfa-nitrógeno y el gamma-carboxi forman los enlaces amida con los dos residuos vecinos
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Hyp	n/a	4-hidroxiprolina
Ile	I	Isoleucina
Imp	n/a	 Desaminohistidina o desaminoHis o des-amino-histidina o ácido (3-(imidazol-4-il)propiónico o ácido imidazopropiónico
Leu	L	Leucina

Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, o Fmoc-Lys(Alloc)-OH suministrado de, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech o NovabioChem. El ácido 3-(N-1-tritil-imidazol-4-il)-propiónico se usa para incorporar Imp.

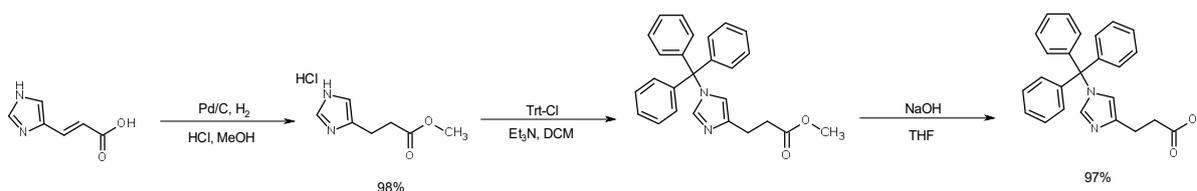
La SPPS puede realizarse mediante el uso de química basada en Fmoc en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 EE.UU.). Una resina adecuada para la preparación de ácidos carboxílicos C-terminales es una resina Wang precargada con un aminoácido tal como la resina Fmoc-Thr(tBu)-Wang (baja carga, 0,35 mmol/g). En los casos en que el sustituyente está unido a la lisina C-terminal, una resina adecuada es una Fmoc-Lys(Mtt)-Wang precargada. Una resina adecuada para la preparación de amidas peptídicas C-terminales es la resina H-Rink Amide-ChemMatrix (que carga, por ejemplo, 0,52 mmol/g) o la resina de poliestireno Rink Amide AM (Novabiochem, que carga, por ejemplo, 0,62 mmol/g) o similares. La eliminación de la protección con Fmoc se logra con piperidina al 20 % en NMP. Los acoplamientos peptídicos se realizan mediante el uso ya sea de DIC/HOAt/colidina o DIC/Oxima Pura con o sin colidina con o sin preactivación o mediante el uso de DEPBT (3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona)/DIPEA para la supresión de la epimerización de, por ejemplo, His durante el acoplamiento. Las soluciones de aminoácido/HOAt o aminoácido/Oxima Pura (0,3 M/0,3 M en NMP a un exceso molar de 3-10 veces) se añadieron a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) seguido por colidina (3 M en NMP). Por ejemplo, pueden usarse las cantidades siguientes de solución de aminoácido/HOAt 0,3 M por acoplamiento para las siguientes reacciones en escala: Escala/ml, 0,05 mmol/1,5 ml, 0,10 mmol/3,0 ml, 0,25 mmol/7,5 ml.

Si se usa Fmoc-Lys(Mtt)-OH, el grupo Mtt puede eliminarse lavando la resina con HFIP/DCM (75:25) (2 x 2 min), lavando con DCM y suspendiendo la resina en HFIP/DCM (75:25) (2 x 20 min) y posteriormente se lava antes de que el sustituyente pueda introducirse en la posición épsilon del resto de lisina.

Si se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH, el grupo Alloc puede eliminarse al tratar la resina con Pd(PPh₃)₄ (0,02 equiv) en presencia de uno o más depuradores en combinación, por ejemplo, morfolina (6,0 equiv) y/o complejo de dimetil borano (18,0 equiv) (30 min). La resina se lava después con MeOH, NMP o DMF e IPA (alcohol isopropílico), respectivamente, antes de que el sustituyente pueda introducirse en la posición épsilon del resto de lisina.

Síntesis de Imp (desaminoHis(Trt)-OH)

Imp (desaminoHis) puede sintetizarse a partir de ácido urocánico en un procedimiento de tres etapas que proporciona el ácido libre de Imp con una protección de tritilo (desaminoHis(Trt)-OH) (ver el Esquema a continuación).



Se proporciona un Imp ilustrativo sintetizado mediante el uso del procedimiento de tres etapas:

Etapa 1: Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 150 g, 1,41 mol) a una solución de ácido urocánico (**1**, 1,01 kg, 7,33 mol) en MeOH (5,50 L), agua (5,50 L) y HCl al 35 % (752 ml, 8,59 mol) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 4 días. La conversión de la reacción se monitoreó mediante ¹H NMR. El catalizador se filtró después de la terminación y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se redisolvió en MeOH (7,00 L) y se añadió solución de HCl 2,2 M en MeOH (500 ml) y se agitó durante 16 horas a 45 °C. Los solventes se eliminaron por evaporación hasta la sequedad. Se añadieron MeOH (10,0 L) y HCl (47,0 g) en MeOH (1,00 l) y se agitó durante una noche a 45 °C. La mezcla se evaporó hasta la sequedad para proporcionar clorhidrato de éster metílico de ácido 3-(1H-imidazol-4-il)-propiónico (**2**) como un sólido blanquecino. Rendimiento: 1,37 kg (98 %). ¹H NMR (300 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7,40-7,28 (m, 10 H); 7,19-7,07 (m, 6 H); 6,55 (s, 1 H); 3,63 (s, 3 H); 2,94-2,83 (m, 2 H); 2,71-2,62 (m, 2 H).

Etapa 2: Se añadió cloruro de tritilo (Trt-OH) (2,04 kg, 7,33 mol) a una solución del producto anterior (**2**, 1,37 kg, 7,20 mol) en DCM seco (25,2 L) y se añadió Et₃N (2,62 L, 18,7 mol). La mezcla se agitó a 23 °C durante la noche. La solución resultante se lavó con agua (15,0 L), la fase acuosa se extrajo nuevamente con DCM (2,50 L). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico (10,0 L) y la fase acuosa se extrajo nuevamente con DCM (2,50 L). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (10,0 L) y la fase acuosa se extrajo nuevamente con DCM (2,50 L). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar éster metílico de ácido 3-(1-tritil-1H-imidazol-4-il)-propiónico (**3**) como un sólido blanco.

5 Etapa 3: Se añadió una solución de NaOH (570 g, 14.3 mol) en agua (5,00 L) a una solución del éster anterior (**3**) en THF (20,0 L); la mezcla resultante se agitó a 23 °C durante la noche. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico (10 %, 15,0 L) al residuo y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 5,00 L). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 x 5,00 l), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporaron para obtener material cristalino. El residuo se suspendió en DCM (2,50 L) y se añadió ciclohexano (10,0 L). El sólido se filtró, se lavó con ciclohexano (7,00 L). El producto contenía 0,34 % de subproducto, por lo que el sólido se suspendió en MeOH (20,0 L) y se filtró. El sólido se secó en aire y se redisolvió en DCM a reflujo (10,0 L) y el solvente se eliminó por evaporación. El sólido se homogeneizó para proporcionar un producto del título (**4**) como un polvo blanco.

10 Rendimiento: 2679.2 g (97 %). Espectro de ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10,49 (bs, 1 H); 7,48 (s, 1 H); 7,41-7,28 (m, 9 H); 7,18-7,05 (m, 6 H); 6,60 (s, 1 H); 2,93-2,81 (m, 2 H); 2,77-2,65 (m, 2 H). Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD). LC-MS R_t (Kinetex C18, 4,6 mm x 50 mm, MeCN/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0,1 %): 2,82 min. LC-MS m/z: 383,2 (M+H)⁺. m.p.: 190-191 °C. pureza por UPLC: 99,74 % (214 nm). UPLC R_t (Acquity UPLC BEHC18, 1,7 um, 2,1 x 150 mm, 40 °C, MeCN/agua 05:95 a 100:0 + TFA al 0,05 %, 6 min.): 2,512 min. Nivel de endotoxina: < 0,06 EU/mL (estimado mediante la prueba PYROGENT Plus de lisado de amebocitos del Limulus mediante el uso de una solución de 1 mg de compuesto en DMSO acuoso al 10 %).

Unión del sustituyente

20 El sustituyente puede introducirse en un procedimiento por etapas mediante el sintetizador de péptidos Prelude como se describió anteriormente, mediante el uso de bloques de construcción protegidos adecuadamente, tales como los aminoácidos estándar descritos anteriormente, ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico y Fmoc-Glu-OtBu. La introducción del resto de ácido graso puede lograrse mediante el uso de un bloque de construcción, tal como, pero sin limitarse a, mono-terc-butil-éster del ácido octadecanodioico. Después de cada etapa de acoplamiento, el intermediario peptídico sin reaccionar puede taponarse mediante el uso de anhídrido acético y exceso de colidina (> 10 eq.).

Después de cada etapa de acoplamiento, el intermediario peptídico sin reaccionar puede taponarse mediante el uso de anhídrido acético y exceso de colidina (> 10 eq.).

30 La introducción de un sustituyente en el nitrógeno épsilon de una lisina se logra mediante el uso de una lisina protegida con Mtt (Fmoc-Lys(Mtt)-OH), Alloc (Fmoc-Lys(Alloc)-OH) o un grupo ivDde (Fmoc-Lys(ivDde)-OH). La incorporación de restos de γGlu en el sustituyente puede lograrse mediante el acoplamiento con el aminoácido Fmoc-Glu-OtBu.

35 La introducción de cada resto en el sustituyente puede lograrse mediante el uso de un tiempo de acoplamiento prolongado (1 x 6 horas) seguido de taponado con anhídrido acético o alternativamente ácido acético/DIC/HOAt/colidina.

Escisión de la resina

Después de la síntesis la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIS/agua (95/2,5/2,5) o TFA/EDT (1,2-etanoditiol)/agua (90/5/5) seguido de la precipitación con Et₂O (éter dietílico) o IPE (éter diisopropílico). El precipitado se lava después con el solvente usado.

Purificación y cuantificación

El péptido bruto se disuelve en una mezcla adecuada de agua y MeCN, tal como agua/MeCN (4:1) o agua/AcOH (1:1) a 60 °C durante 1 hora, y se purifica mediante HPLC preparativa de fase inversa (Waters Deltaprep 4000 o Gilson) en una columna que comprende gel de sílice C8 o C18. La elución se realiza con un gradiente creciente de MeCN en agua que contiene TFA al 0,1 %. Las fracciones relevantes se revisan mediante HPLC analítica o UPLC. Las fracciones que comprenden el péptido diana puro se mezclan y se concentran a presión reducida. Puede introducirse una etapa de purificación adicional mediante el uso de otro gradiente, por ejemplo, que contiene NH₄HCO₃ 0,05 M. La solución resultante se analiza (HPLC, LCMS) y el producto (es decir, el derivado) se cuantifica mediante el uso de un detector de quimioluminiscencia específico para nitrógeno de HPLC (Antek 8060 HPLC-CLND) o mediante la medición de la absorción UV a 280 nm. El producto se dispensa en viales de vidrio. Los viales se taponan con prefiltros de fibra de vidrio Millipore. La liofilización proporciona el trifluoroacetato peptídico como un sólido blanco.

60 En algunas modalidades, el trifluoroacetato de péptido puede cambiarse a la sal de sodio mediante intercambio iónico en columna, por ejemplo, con NaOAc en MeCN. Alternativamente, el trifluoroacetato de péptido puede cambiarse a la sal de amonio mediante cromatografía en columna, por ejemplo, con un gradiente que contiene NH₄HCO₃ 0,05 M, seguido de liofilización y suspensión en agua. En algunas modalidades, el péptido se transforma después en la sal de sodio mediante la adición de NaOH 1 M (equivalente de acuerdo con los residuos básicos/ácidos) haciendo que la suspensión sea transparente. Finalmente, la sal de sodio del péptido puede aislarse mediante liofilización.

Productos Intermedios

En la presente descripción se describe un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 seleccionado del grupo que consiste en:

5 amida de [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido;

[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido; y

10 amida de [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

15 En la presente descripción se describe un producto intermedio en la forma de un análogo de GLP-1 seleccionado del grupo que consiste en:

amida de [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido;

20 [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido; y

amida de [Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

25 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden prepararse mediante el siguiente método de síntesis por etapas que comprende (i) preparación del análogo de GLP-1 intermedio seguido de (ii) unión del sustituyente. La etapa (i) de este método puede lograrse mediante el uso de síntesis en fase sólida estándar como se describe en la sección experimental mediante el uso de aminoácidos protegidos; después de la escisión de la resina el análogo de GLP-1 puede someterse a purificación mediante el uso de HPLC preparativa como se describe en la sección experimental en la presente descripción para proporcionar el producto intermedio. Alternativamente, la etapa (i) de este método, la preparación del producto intermedio, puede llevarse a cabo mediante el uso de una síntesis semirrecombinante como se describió en el documento WO2009/083549. La etapa (ii) de este método, es decir, la unión del sustituyente al producto intermedio que conduce al producto final, así como también la preparación del sustituyente en sí, puede lograrse mediante el uso de los métodos descritos en el documento WO2009/083549.

35 **Sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable**

Los derivados o productos intermedios de la invención pueden estar en la forma de una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable. Las sales se forman, por ejemplo, mediante una reacción química entre una base y un ácido, por ejemplo: $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 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.

45 Las sales de los derivados o productos intermedios de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos entre grupos aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos grupos pueden ubicarse en el resto peptídico, y/o en el sustituyente de los derivados o productos intermedios de la invención.

Los ejemplos no limitantes de grupos aniónicos de los derivados o productos intermedios de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en el sustituyente, si los hay, así como también en el resto peptídico. El resto peptídico incluye frecuentemente grupos carboxílicos libres en los residuos aminoácidos ácidos internos tales como Asp y Glu.

Los ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en el resto peptídico incluyen el grupo amino libre en el extremo N-terminal, si se presenta, así como también cualquier grupo amino libre de residuos aminoácidos básicos internos tales como His, Arg y Lys.

El éster de los derivados o productos intermedios de la invención puede formarse, por ejemplo, mediante la reacción de un grupo de ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que conduce al reemplazo de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi. La formación de ésteres puede implicar el grupo carboxílico libre en el extremo C-terminal del péptido, y/o cualquier grupo carboxílico libre en el sustituyente.

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

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

5 En el presente contexto, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” pretende indicar una sal que no es dañina para el paciente. Dichas sales incluyen sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquiladas. Las sales por adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos así como también de ácidos orgánicos.

10 En algunas modalidades, el péptido está en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el péptido está en la forma de una amida farmacéuticamente aceptable, preferentemente, con un grupo amida en el extremo C-terminal del péptido. En algunas modalidades, el péptido está en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable.

15 **Propiedades funcionales**

Los derivados de GLP-1 de la invención son capaces de unirse y activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón. En otras palabras, el derivado de GLP-1 de la invención es tanto un agonista del receptor de glucagón como un agonista del receptor de GLP-1, también denominado en la presente descripción un “coagonista del receptor de GLP-1/glucagón”. En algunas modalidades, los derivados de GLP-1 de la invención son, preferentemente, agonistas de los receptores de GLP-1 y glucagón como se refleja por su potencia sobre ambos receptores.

20 En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene un valor de EC_{50} más bajo sobre el receptor de GLP-1 que sobre el receptor de glucagón.

También, o alternativamente, en algunas modalidades, el derivado de GLP-1 es químicamente estable, físicamente estable y soluble, por ejemplo, la estabilidad química, la estabilidad física y la solubilidad del derivado de GLP-1 permite una suficiente estabilidad de almacenamiento del derivado de GLP-1 en una composición farmacéutica líquida.

30 También, o alternativamente, en algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una buena unión al receptor y potencia sobre el receptor de glucagón, por ejemplo, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1) o glucagón humano.

35 También, o alternativamente, en algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una buena unión al receptor y potencia sobre el receptor de GLP-1, por ejemplo, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1) o glucagón humano.

40 También, o alternativamente, en algunas modalidades, los derivados de GLP-1 tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas.

También, o alternativamente, en algunas modalidades el derivado de GLP-1 es un derivado alargado, por ejemplo, en comparación con GLP-1 humano (SEQ ID NO: 1) o glucagón humano.

45 Unión al receptor y potencia

Los derivados de la invención son coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón, es decir, tanto agonistas del receptor de GLP-1 como agonistas del receptor de glucagón.

50 Un agonista del receptor puede definirse como un péptido (por ejemplo, un derivado de GLP-1) que se une a un receptor y provoca una respuesta típica del ligando natural. Así, por ejemplo, un “agonista del receptor de GLP-1” puede definirse como un compuesto que es capaz de unirse al receptor de GLP-1 humano y es capaz de activarlo completamente o parcialmente. De manera similar, la expresión “agonista del receptor de glucagón” como se usa en la presente descripción puede definirse como un compuesto que es capaz de unirse al receptor de glucagón y es capaz de activarlo completamente o parcialmente. Una respuesta típica del ligando natural puede ser la activación completa o parcial de las vías de transducción de señales intracelulares, tal como la activación de la adenilato ciclasa y el aumento de los niveles del AMPc intracelular, mediando los efectos fisiológicos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, la expresión “actividad sobre el receptor de GLP-1” se refiere a la capacidad de unirse al receptor de GLP-1 e iniciar una vía de transducción de señales lo que da como resultado la acción insulínica u otros efectos fisiológicos como se conoce en la técnica.

Los derivados o análogos de la invención pueden analizarse para determinar la actividad del receptor de GLP-1 mediante el uso del Ensayo (I)(a) o Ensayo (II)(a) descritos en la presente descripción o para determinar la actividad del receptor de glucagón mediante el uso del Ensayo (I)(b) o Ensayo (II)(b) descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, la expresión "actividad sobre el receptor" como se usa en la presente descripción se refiere al efecto de un agonista del receptor.

5 En algunas modalidades la expresión "receptor de glucagón" como se usa en la presente descripción significa el receptor de glucagón humano. En algunas modalidades la expresión "receptor de GLP-1" como se usa en la presente descripción significa el receptor de GLP-1 humano.

Actividad biológica - afinidad y potencia in vitro

10 En algunas modalidades, los términos "afinidad" o "unión al receptor" como se define en la presente descripción se refiere a la afinidad de unión al receptor in vitro, es decir, el rendimiento en un ensayo de afinidad de unión al receptor de GLP-1 y en un ensayo de afinidad de unión al receptor de glucagón, más en particular a la capacidad de unión al receptor de GLP-1 humano y al receptor de glucagón humano. La afinidad de unión del receptor de GLP-1 humano puede medirse en un ensayo de unión, por ejemplo, en membranas de una línea celular BHK que expresa establemente el receptor de GLP-1 humano. El GLP-1 marcado radioactivamente se une al receptor y puede ser desplazado competitivamente por un compuesto (por ejemplo, derivados de GLP-1). El radioligando unido restante puede determinarse mediante la adición de perlas del ensayo de proximidad de centelleo (SPA) que se unen a las membranas celulares y cuando la radioactividad está cerca de la perla produce una luz que se mide y es una medida de la afinidad de unión in vitro del compuesto. Un ejemplo no limitante de un ensayo para la determinación de la afinidad de unión se describe en el Ensayo (II) en la presente descripción. La afinidad de unión del receptor de glucagón humano puede medirse en un ensayo de afinidad de unión, por ejemplo, en membranas de una línea celular BHK que expresa establemente el receptor de glucagón humano. El glucagón marcado radioactivamente se une al receptor y puede ser desplazado competitivamente por un compuesto (por ejemplo, derivados de GLP-1). El radioligando unido restante puede determinarse mediante la adición de perlas del ensayo de proximidad de centelleo (SPA) que se unen a las membranas celulares y cuando la radioactividad está cerca de la perla produce una luz que se mide y es una medida de la afinidad de unión in vitro del compuesto.

20 El término concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) se refiere generalmente a la concentración del compuesto competidor que desplaza el 50 % de la unión específica de la unión del radioligando que corresponde a la mitad entre el valor basal y el máximo, en referencia a la curva de respuesta a dosis. La IC_{50} se usa como una medida de la afinidad de unión de un compuesto y es la concentración donde se observa el 50 % de su unión máxima.

30 La unión in vitro de los derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse como se describió anteriormente y determinarse la IC_{50} del péptido en cuestión. A menor valor de IC_{50} , mejor será la afinidad de unión.

35 En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una afinidad de unión in vitro sobre el receptor de GLP-1 determinada mediante el uso del método descrito en el Ensayo (II)(a) en la presente descripción, que corresponde a una IC_{50} de o por debajo de 100 nM, con mayor preferencia por debajo de 10 nM, aún con mayor preferencia por debajo de 5 nM o con la máxima preferencia por debajo de 1 nM.

40 El derivado de GLP-1 puede tener una afinidad de unión in vitro sobre el receptor de glucagón, determinada mediante el uso del método descrito en el Ensayo (II)(b) en la presente descripción, que corresponde a una IC_{50} de o por debajo de 100 nM o por debajo de 50 nM o por debajo de 10 nM.

45 En algunas modalidades, la potencia y/o actividad se refiere a la potencia in vitro, es decir, el rendimiento en un ensayo del receptor de GLP-1 funcional y un ensayo del receptor de glucagón, más en particular a la capacidad de activar el receptor de GLP-1 humano y el receptor de glucagón humano. La respuesta del receptor de GLP-1 humano puede medirse en un ensayo de gen reportero, por ejemplo, en una línea celular BHK que expresa establemente el receptor de GLP-1 humano y comprende el ADN para el elemento de respuesta al AMPc (CRE) acoplado a un promotor y el gen para luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). 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 expresión de luciferasa puede determinarse mediante la adición de luciferina, que es convertida 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 un ensayo para la determinación de la potencia del receptor se describe en el Ensayo (I) en la presente descripción. La respuesta del receptor de glucagón humano puede medirse en un ensayo de gen reportero, por ejemplo, en una línea celular BHK que expresa establemente el receptor de glucagón humano y comprende el ADN para el elemento de respuesta al AMPc (CRE) acoplado a un promotor y el gen para luciferasa de luciérnaga (CRE luciferasa). Cuando se produce AMPc como resultado de la activación del receptor de glucagón, esto a su vez resulta en la expresión de la luciferasa. La expresión de luciferasa puede determinarse mediante la adición de luciferina, que es convertida por la enzima en oxiluciferina y produce bioluminiscencia, que se mide y es una medida de la potencia in vitro.

50 El término concentración eficaz semimáxima (EC_{50}) 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. La EC_{50} se usa como una medida de la potencia de un compuesto (por ejemplo, derivados de GLP-1) y es la concentración donde se observa el 50 % de su efecto máximo.

La potencia del receptor *in vitro* de los derivados de GLP-1 de la invención puede determinarse como se describió anteriormente y determinarse la EC_{50} del péptido en cuestión. A menor valor de EC_{50} , mejor será la potencia.

Coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón

5 Un coagonista del receptor de GLP-1/glucagón puede definirse como un péptido que es capaz de activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón. El derivado de la invención tiene una CE_{50} por debajo de 1 nM sobre el receptor de GLP-1 y una CE_{50} por debajo de 10 nM sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades el derivado de la invención tiene una EC_{50} por debajo de 100 pM sobre el receptor de GLP-1 y tiene una CE_{50} por debajo de 100 pM sobre el receptor de glucagón; o tiene una CE_{50} por debajo de 50 pM sobre el receptor de GLP-1 y tiene una CE_{50} por debajo de 100 pM sobre el receptor de glucagón; o tiene una CE_{50} por debajo de 10 pM sobre el receptor de GLP-1 y tiene una CE_{50} por debajo de 50 pM sobre el receptor de glucagón. La CE_{50} puede determinarse como se describe en el Ensayo (I) en la presente descripción.

15 En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene un valor de EC_{50} más bajo sobre el receptor de GLP-1 que sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y de EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 100 a 250, tal como en el intervalo de 50 a 100, en el intervalo de 20 a 50, en el intervalo de 10 a 20, o en el intervalo de 1 a 10. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y de EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 50 a 100. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y de EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 20 a 50. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y de EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 10 a 20. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de EC_{50} sobre el receptor de glucagón y de EC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 1 a 10. En algunas modalidades, la CE_{50} sobre el receptor de GLP-1 se determina de acuerdo con el Ensayo (I)(a) descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la CE_{50} sobre el receptor de glucagón se determina de acuerdo con el Ensayo (I)(b) descrito en la presente descripción.

30 El derivado de GLP-1 puede tener una potencia (EC_{50}) sobre el receptor de glucagón por debajo de 10 nM o por debajo de 1 nM o 100 pM o por debajo de 10 pM. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una $EC_{50} < 10$ nM sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una $EC_{50} < 1$ nM sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una $EC_{50} < 100$ pM sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una $EC_{50} < 10$ pM sobre el receptor de glucagón.

35 Los derivados de GLP-1 de la presente invención pueden tener una CE_{50} sobre el receptor de GLP-1 por debajo de 1 nM o por debajo de 100 pM o por debajo de 50 pM o por debajo de 10 pM. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una CE_{50} por debajo de 100 pM sobre el receptor de GLP-1. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una CE_{50} por debajo de 50 pM sobre el receptor de GLP-1. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una CE_{50} por debajo de 10 pM sobre el receptor de GLP-1.

40 La potencia, es decir, la EC_{50} , sobre el receptor de GLP-1 de un derivado de GLP-1 de la invención puede determinarse de acuerdo con el Ensayo (I)(a) descrito en la presente descripción. La potencia, es decir, la EC_{50} , sobre el receptor de glucagón de un derivado de GLP-1 de la invención puede determinarse de acuerdo con el Ensayo (I)(b) descrito en la presente descripción.

45 El derivado de la invención tiene una IC_{50} por debajo de 35 nM sobre el receptor de GLP-1 y una IC_{50} por debajo de 150 nM sobre el receptor de glucagón. La IC_{50} puede determinarse como se describe en el Ensayo (II) en la presente descripción.

50 En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene un valor de IC_{50} más bajo sobre el receptor de GLP-1 que sobre el receptor de glucagón. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene una relación entre su valor de IC_{50} sobre el receptor de glucagón y de IC_{50} sobre el receptor de GLP-1 en el intervalo de 1 a 5, tal como en el intervalo de 5 a 10, en el intervalo de 10 a 15, en el intervalo de 15 a 25; o tal como en el intervalo de 25 a 100, o por encima de 100.

55 Actividad biológica - farmacología *in vivo*

En algunas modalidades, los derivados de GLP-1 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.

60 El ratón con obesidad inducida por dieta (DIO) es un ejemplo de un modelo animal adecuado y el efecto sobre el peso corporal, la ingestión de alimentos y la tolerancia a la glucosa puede evaluarse durante la administración de la dosis subcrónica en este modelo. El efecto sobre el peso corporal y la glucosa en sangre puede determinarse en tales ratones *in vivo*. La ingestión de alimentos puede evaluarse al alojar individualmente animales y pesar el alimento consumido por día. Este modelo puede usarse, además, para evaluar los efectos sobre la tolerancia a la glucosa mediante la realización de una prueba de tolerancia a la glucosa oral o intraperitoneal (OGTT o IPGTT).

Estas pruebas se realizan mediante la administración de una carga de glucosa por vía oral o intraperitonealmente a animales sometidos a semiayuno y la medición posterior de la glucosa en sangre por hasta tres horas.

Perfil farmacocinético

5 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden tener propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como un aumento de la vida media terminal, por ejemplo, en comparación con GLP-1 humano o glucagón humano. Preferentemente, los derivados de GLP-1 de la invención tienen propiedades farmacocinéticas adecuadas para la administración una vez al día o menos.

10 Las propiedades farmacocinéticas de los derivados de GLP-1 de la invención pueden determinarse de manera adecuada en estudios farmacocinéticos (PK) in vivo. Tales estudios se realizan para evaluar cómo los compuestos farmacéuticos se absorben, distribuyen, y eliminan en el cuerpo, y cómo estos procesos afectan la concentración del compuesto en el cuerpo, en el transcurso del tiempo.

15 En el descubrimiento y la fase preclínica del desarrollo farmacéutico de fármacos, los modelos animales tales como el ratón, rata, mono, perro, o cerdo, pueden usarse para realizar esta caracterización. Cualquiera de estos modelos puede usarse para probar las propiedades farmacocinéticas de los derivados de GLP-1 de la invención.

20 En tales estudios, los animales se administran típicamente con una única dosis del fármaco, ya sea por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), u oral (p.o.) en una composición farmacéutica relevante. Se extraen las muestras de sangre en puntos temporales predefinidos después de la administración de la dosis, y las muestras se analizan para determinar la concentración del fármaco con un ensayo cuantitativo relevante. En base a estas mediciones, se representan los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo y se realiza el denominado análisis farmacocinético no compartimental de los datos.

30 Para la mayoría de los compuestos, la parte terminal de los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo será lineal cuando se dibuje en una gráfica semilogarítmica, lo que refleja que después de la absorción inicial y la distribución, el fármaco se elimina del cuerpo a una tasa fraccional constante. La tasa (λ_z o λ_{z2}) es igual a menos la pendiente de la parte terminal del gráfico. A partir de esta tasa, puede calcularse, además, una vida media terminal, como $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda_z$ (ver, por ejemplo, Johan Gabrielsson y Daniel Weiner: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications, 3ra Ed., Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo (2000)).

35 El aclaramiento puede determinarse después de la administración i.v. y se define como la dosis (D) dividida por el área bajo la curva (AUC) en el perfil de concentración en plasma frente al tiempo (Rowland, M y Tozer TN: Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, 3^{ra} edición, 1995 Williams Wilkins).

40 El cálculo de la vida media terminal y/o la eliminación es relevante para la evaluación de regímenes de administración de la dosis y es un parámetro importante en el desarrollo de fármacos, en la evaluación de nuevos compuestos farmacológicos.

Perfil farmacocinético - vida media in vivo en ratas

45 Las propiedades farmacocinéticas de los derivados de GLP-1 pueden determinarse como la vida media terminal ($T_{1/2}$) in vivo en ratas después de la administración i.v. y s.c. En modalidades adicionales, la vida media terminal de los derivados de GLP-1 es de al menos 1 hora, preferentemente, al menos 3 horas, preferentemente, al menos 4 horas, aún con mayor preferencia, al menos 5 horas, o con la máxima preferencia, al menos 6 horas.

Perfil farmacocinético - vida media in vivo en ratones

50 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden tener propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con GLP-1 humano o glucagón humano. Preferentemente, los derivados de GLP-1 de la invención tienen propiedades farmacocinéticas adecuadas para la administración una vez al día o menos.

55 En algunas modalidades, las propiedades farmacocinéticas de los derivados de GLP-1 pueden determinarse como la vida media terminal ($T_{1/2}$) in vivo en ratones después de la administración i.v. y s.c. En modalidades adicionales, la vida media terminal de los derivados de GLP-1 es de al menos 1 hora, preferentemente, al menos 3 horas, preferentemente, al menos 4 horas, aún con mayor preferencia, al menos 5 horas, o con la máxima preferencia, al menos 6 horas. Un ensayo adecuado para determinar la vida media terminal de los derivados de GLP-1 en ratones después de la administración s.c. se describe en el Ensayo (IV) en la presente descripción.

Perfil farmacocinético - vida media in vivo en minicerdos

65 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden tener propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con hGLP-1 y preferentemente adecuadas para administración una vez al día o una vez a la semana. En algunas

modalidades, las propiedades farmacocinéticas de los derivados de GLP-1 pueden determinarse como la vida media terminal ($T_{1/2}$) *in vivo* en minicerdos después de la administración i.v., por ejemplo, como se describe más abajo.

5 En algunas modalidades, la vida media terminal de los derivados de GLP-1 en minicerdos es de al menos 5 horas, preferentemente, al menos 10 horas, aún con mayor preferencia, al menos 15 horas, o con la máxima preferencia, al menos 20 horas.

10 El propósito de este estudio es determinar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los derivados de GLP-1 después de la administración i.v. a minicerdos. Esto se hizo en un estudio farmacocinético (PK), donde se determina, entre otros parámetros, la vida media terminal y la eliminación del derivado en cuestión. El aumento de la vida media terminal y la disminución de la eliminación significa que el compuesto de estudio se elimina de manera más lenta del cuerpo. Para los derivados de GLP-1 esto implica una duración extendida del efecto farmacológico.

15 En los estudios se usan minicerdos Göttingen hembras 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 ya sea individualmente (cerdos con catéteres permanentes) o en un grupo, y se alimentan de forma restringida una o dos veces al día con dieta SDS para minicerdos (Special Diets Services, Essex, Reino Unido).

20 En algunos estudios, después de al menos 2 semanas de aclimatación, se implantan dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis o cranialis 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. En otros estudios los animales se aclimatan durante 1 semana, después de lo cual se usan para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de reposo farmacológico adecuado entre las dosificaciones sucesivas de los derivados de GLP-1. En cada momento de administración de la dosis, a estos cerdos se les coloca un catéter intravenoso periférico en una vena de la oreja a través del cual se dosifican los derivados. El muestreo de sangre se realiza por venopunción en la v. jugularis o en la v. cava cranialis

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

30 Los derivados de GLP-1 se disuelven generalmente en fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 145 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 a una concentración generalmente de 20-60 nmol/ml. Se administran inyecciones intravenosas (el volumen que corresponde a usualmente 2-3 nmol/kg, por ejemplo, 0,1 ml/kg) de los compuestos a través de un catéter o a través del catéter intravenoso periférico, y se toman muestras de sangre en puntos temporales predefinidos hasta 13 días después de la administración de la dosis (preferentemente, a través del otro catéter o por venopunción). Las muestras de sangre (por ejemplo, 0,8 ml) se recolectan en tubos con tampón EDTA (8 mM) (a veces se añadió aprotinina 500 KIU/ml de sangre) y después se centrifugan a 4 °C y 1942 G durante 10 minutos. El plasma se pipetea en tubos Micronic en hielo seco, y se mantiene a -20 °C hasta analizarse para determinar la concentración en plasma del derivado de GLP-1 respectivo mediante el uso de un ensayo cuantitativo apropiado como ELISA o LC-MS.

35 En base a estas mediciones, se grafican los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo para el compuesto del estudio, y se realiza el denominado análisis farmacocinético no compartimental de los datos en WinNonlin v. 5.0 o Phoenix v. 6.2 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.) u otro programa informático relevante para el análisis de PK. Para la mayoría de los compuestos, la parte terminal de los perfiles de concentración plasmática será lineal cuando se dibuje en una gráfica semilogarítmica, lo que refleja que después de la absorción inicial y la distribución, el fármaco se elimina del cuerpo a una tasa fraccional constante. La tasa (λ_Z o λ_z) es igual a menos la pendiente de la parte terminal del gráfico. A partir de esta tasa, puede calcularse, además, la vida media terminal, como $t_{1/2} = \ln(2) / \lambda_z$ (ver, por ejemplo, Johan Gabrielsson y Daniel Weiner: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts & Applications, 3ra Ed., Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo (2000)). La eliminación se define como la dosis (D) dividida por el área bajo la curva (AUC) sobre el perfil de concentración plasmática frente al tiempo (Rowland, M y Tozer TN: Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, 3ra edición, 1995 Williams Wilkins).

45 Cuando los compuestos de acuerdo con la presente invención se probaron en minicerdos como se describió anteriormente, se observó un tiempo de vida media *in vivo* significativamente prolongado.

60 Estabilidad física

Los péptidos pueden experimentar diversos cambios de estado físico. Los péptidos pueden precipitar debido a la falta de solubilidad en un determinado conjunto de condiciones, por ejemplo, debido a la neutralización de las cargas de repulsión en las cadenas laterales de aminoácidos debido a un cambio de pH. Otro cambio físico es la formación de fibrillas amiloides, que implica un cambio conformacional en estructuras de fibras macromoleculares ricas en láminas beta. Otras estructuras macromoleculares pueden estar formadas por repeticiones estructurales menos

sistemáticas debido a la agregación. En los dos últimos casos, la sustancia peptídica puede observarse eventualmente como un precipitado. De hecho, estos cambios físicos pueden estar relacionados en cierta medida, por ejemplo, la solubilidad frente al pH y la formación de fibrillas están relacionadas [Schmittschmitt y Scholtz, Protein Science, 12, 10, 2374-2378, 2003]. Además, es muy difícil distinguir estos fenómenos solo mediante inspección visual, por lo tanto, el resultado de estos cambios frecuentemente se describe con el término general "precipitado".

Otros cambios de estado físico incluyen la adsorción a superficies observadas como una pérdida de contenido de péptido de la solución, y el cambio de una solución líquida a un gel. Sin embargo, la observación de un precipitado independientemente de su naturaleza o la formación de un gel es un problema cuando está en un inyectable farmacéutico durante su almacenamiento y tiempo de uso.

La expresión "estabilidad física" del derivado o la composición como se usa en la presente descripción se refiere a la tendencia del péptido y/o la proteína (es decir, el derivado de GLP-1 en la presente descripción) a formar agregados inactivos biológicamente y/o insolubles del péptido y/o la proteína como un resultado de la exposición del péptido y/o la proteína a estrés termomecánico y/o interacción con las interfaces y las superficies que son desestabilizantes, tales como las superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las composiciones acuosas de péptidos y/o proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer la composición vertida en contenedores adecuados (por ejemplo, cartuchos o frascos) a estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. La inspección visual de las composiciones se realiza en una luz nítida enfocada con un fondo oscuro. La turbidez de la composición se caracteriza mediante una calificación visual por asignación de una puntuación del grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una composición que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una composición que muestra visualmente una turbidez a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una composición puede clasificarse como inestable físicamente con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra una turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la composición puede evaluarse mediante mediciones simples de la turbidez bien conocidas por los expertos. La estabilidad física de las composiciones acuosas de péptidos y/o proteínas puede evaluarse, además, mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional del péptido y/o la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferencialmente a un conformero no nativo del péptido y/o la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura peptídica y/o proteica es la Tioflavina T. La Tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y tal vez también de otras configuraciones de péptidos y/o proteínas, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de péptido y/o proteína fibrilar. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

Pueden usarse otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura péptidos y/o proteínas de estados naturales a no naturales. Por ejemplo, las sondas de "parches hidrófobos" que se unen preferencialmente a parches hidrófobos expuestos de un péptido y/o una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de un péptido y/o una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos a medida que un péptido y/o una proteína comienzan a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes hidrófobos, aromáticos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares.

La estabilidad física del derivado puede determinarse por la recuperación y/o el tiempo de retraso en el Ensayo (III) descrito en la presente descripción, es decir, el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado físicamente estable tiene más del 70 % de recuperación y/o más de 7 horas de tiempo de retraso en el Ensayo (III) descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, el derivado tiene más del 70 % de recuperación en un ensayo de fibrilación con ThT, tal como el Ensayo (III) descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el derivado tiene más del 90 %, tal como más del 95 % o más del 98 %, de recuperación en un ensayo de fibrilación con ThT, tal como el Ensayo (III) descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el derivado tiene aproximadamente el 100 % de recuperación en un ensayo de fibrilación con ThT, tal como el Ensayo (III) descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, el derivado tiene más de 7 horas, tal como más de 20 horas o más de 45 horas, tiempo de retraso en un ensayo de fibrilación con ThT, tal como el Ensayo (III) descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene más de 70 % de recuperación en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene más de 90 % de recuperación en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene aproximadamente 100 % de recuperación en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene más de 7 horas de tiempo de retraso en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene más de 20 horas de tiempo de retraso en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene más

de 45 horas de tiempo de retraso en el ensayo de fibrilación con ThT. En algunas modalidades, el ensayo de fibrilación con ThT es el Ensayo (III) descrito en la presente descripción.

Estabilidad química

5 Las expresiones "estabilidad química" y "estable químicamente" cuando se usan junto con el derivado o la composición en la presente descripción se refieren a cambios químicos covalentes en la estructura del péptido que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible menor potencia biológica y/o un aumento potencial de las propiedades inmunogénicas. Pueden formarse diversos productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza del péptido nativo y del entorno al que se expone el péptido. La eliminación de la degradación química muy probablemente puede no evitarse completamente y frecuentemente se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento prolongado. La mayoría de los péptidos son propensos a la desamidación, un proceso en el que se hidroliza el grupo amida de cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas peptídicas se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. Los péptidos que comprenden asparagina o ácido aspártico pueden ser propensos a la isomerización por medio de la formación de una aspartimida intermedia que da lugar al isómero de ácido isoaspártico correspondiente en el que pueden formarse ambos isómeros *D* y *L*. El intermediario de aspartimida también puede conducir a la formación del isómero de ácido aspártico *D*. (Formulation Consideration for Proteins Susceptible to Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization, Wakankar y Borchardt, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, Vol. 95, núm. 11, p 2321). Finalmente, los péptidos también pueden experimentar una escisión hidrolítica en la que los fragmentos peptídicos o aminoácidos individuales se escinden por hidrólisis del enlace peptídico.

La estabilidad química de la composición puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (frecuentemente, la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual frecuentemente se determina mediante la separación de los productos de degradación en función del tamaño y/o carga de la molécula mediante el uso de diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SE-HPLC y/o RP-UPLC).

35 Por lo tanto, como se señaló anteriormente, una "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una composición debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de acuerdo con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

40 La estabilidad química del derivado puede medirse mediante la determinación de la degradación química en el Ensayo (V) descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el derivado tiene menos de 14 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 13 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 12 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 10 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 9 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 7 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 5 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 3 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 2 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 tiene menos de 1 % de degradación en el ensayo de estabilidad química. En algunas modalidades, el derivado químicamente estable tiene una degradación química de menos del 5 %, tal como menos del 4 %, menos del 3 % o menos del 2 %, en donde dicha degradación química puede determinarse mediante el Ensayo (V) descrito en la presente descripción.

Solubilidad

60 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden ser solubles y, por ejemplo, tener una solubilidad de al menos 0,1 mmol/l, tal como al menos 0,2 mmol/l, al menos 0,5 mmol/l o al menos 2 mmol/l. Los derivados de GLP-1 de la invención pueden ser solubles y, por ejemplo, tener una solubilidad de al menos 4 mmol/l, tal como al menos 8 mmol/l, al menos 10 mmol/l, o al menos 15 mmol/l, por ejemplo, en una solución acuosa de fosfato 10 mM.

65 Los derivados de GLP-1 de la invención pueden ser solubles en el intervalo de pH de pH 7,0-8,2, tal como pH 7,0-7,7 o pH 7,2-7,5, o solubles a pH 7,4, por ejemplo, en una solución acuosa de fosfato 10 mM. Específicamente, los derivados de GLP-1 de la invención pueden ser solubles en el intervalo de pH de pH 7,0-8,2 y tener una solubilidad de al menos 0,1 mmol/l, por ejemplo, en una solución acuosa de fosfato 10 mM.

En algunas modalidades, la solubilidad del derivado de GLP-1 es a temperatura ambiente, por ejemplo, 20-25 °C. En algunas modalidades, la solubilidad del derivado de GLP-1 es a baja temperatura, por ejemplo, 4-10 °C, 4-8 °C o 4-5 °C.

En el presente contexto, si no se indica de cualquier otra manera, los términos "soluble", "solubilidad", "soluble en solución acuosa", "solubilidad acuosa", "soluble en agua", "soluble en-agua", "solubilidad en agua" y "solubilidad en-agua", se refieren a la solubilidad de un compuesto en agua o en una sal acuosa o solución tampón acuosa, por ejemplo, una solución de fosfato 10 mM o en una solución acuosa que contiene otros compuestos y, por ejemplo, a temperatura ambiente. La solubilidad puede evaluarse mediante el uso del siguiente ensayo:

Ensayo de solubilidad dependiente del pH

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

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

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

Estabilidad frente a la DPP-IV

En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 es un compuesto protegido frente a la DPP-IV. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 es un compuesto estabilizado frente a la DPP-IV.

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

Combinaciones

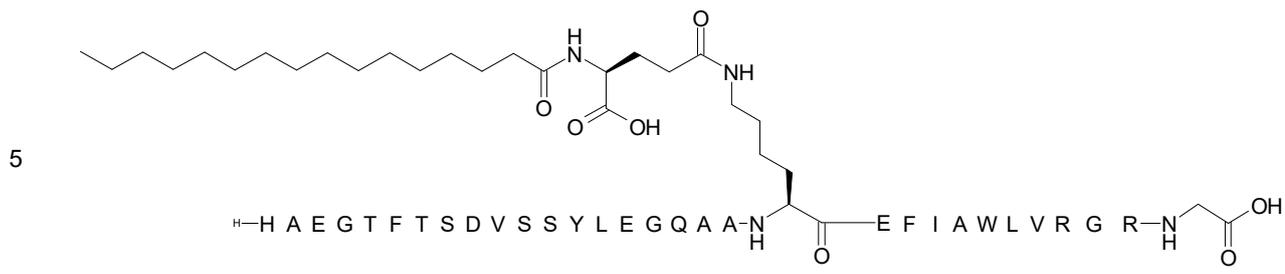
En algunas modalidades, la invención se refiere al derivado de GLP-1 de la invención en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos adicionales, tales como un compuesto de GLP-1 o con un compuesto de insulina. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 de la invención está en combinación con un compuesto de GLP-1. En algunas modalidades, el derivado de GLP-1 de la invención está en combinación con un compuesto de insulina.

Como se usa en la presente descripción, un "compuesto de GLP-1" es un compuesto que puede activar el receptor de GLP-1 y no, por ejemplo, el receptor de glucagón.

Como se usa en la presente descripción, un "compuesto de insulina" es un compuesto que puede activar el receptor de insulina.

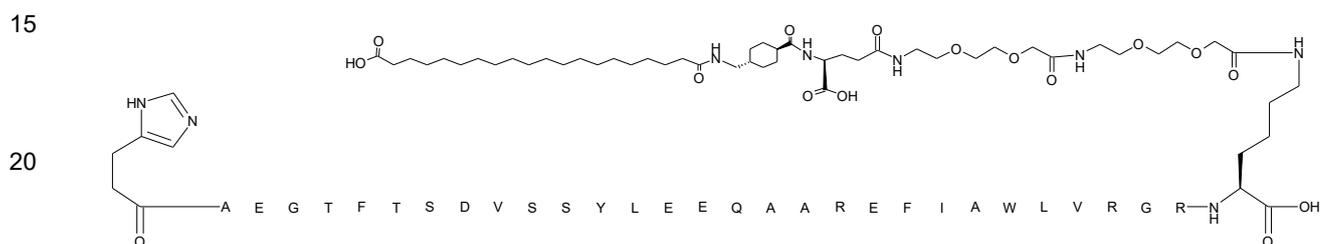
En algunas modalidades, el compuesto de GLP-1 de la combinación se selecciona del grupo que consiste en:

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



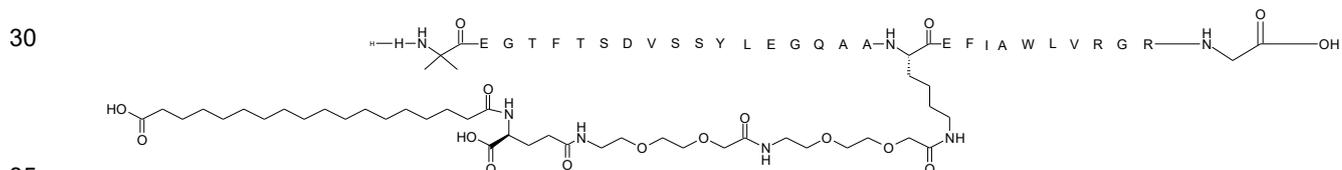
(compuesto G1);

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxinadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino]butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Des aminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37):



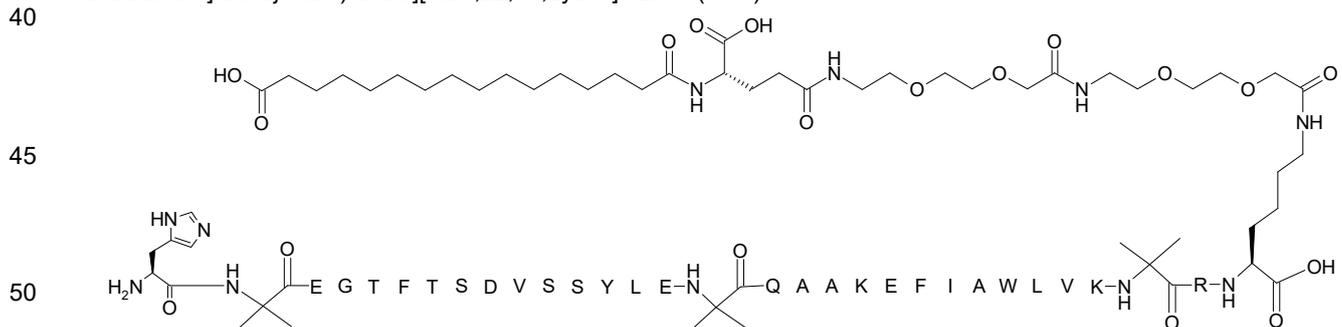
(compuesto G2);

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



(compuesto G3);

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi}-etoxi)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-acetil][Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37):

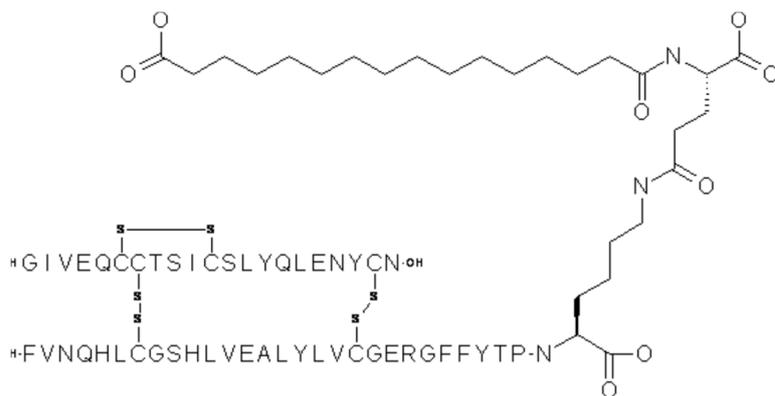


(compuesto G4);

55 y sus sales, amidas, alquilos o ésteres farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, el compuesto de insulina de la combinación es: N-épsilon-B29-[(S)-4-Carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butiril] desB30 insulina humana:

(compuesto G5).



Composiciones Farmacéuticas

- 5 En algunas modalidades, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el derivado de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, la composición es adecuada para la administración parenteral, tal como la administración SC, IM o IV. La expresión “composición farmacéutica” como se usa en la presente descripción, significa un producto que comprende un compuesto activo o
- 10 una sal de este junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante, y opcionalmente un modificador de tonicidad y/o un estabilizante. Por lo tanto, una composición farmacéutica se conoce también en la técnica como una formulación farmacéutica. Las expresiones “composición farmacéutica”, “composición” y “formulación” se usan indistintamente en la presente descripción.
- 15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na edición, 1995.
- 20 En algunas modalidades, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de la invención, en donde dicho derivado de GLP-1 está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, tal como de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml y de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, y en donde dicha composición tiene un pH de 2,0 a 10,0. La composición farmacéutica puede comprender un derivado de la invención, en donde dicho derivado de GLP-1
- 25 está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, y en donde dicha composición tiene un pH de 2,0 a 10,0.
- En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una solución acuosa de un derivado de la invención, y un tampón, en donde dicho derivado de GLP-1 está presente en una concentración de 0,01 mg/ml o más, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0. En algunas
- 30 modalidades, la composición farmacéutica comprende una solución acuosa de un derivado de la invención, y un tampón, en donde dicho derivado de GLP-1 está presente en una concentración de 0,01 mg/ml o más, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.
- En algunas modalidades, la composición de la invención tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0. En algunas modalidades, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En algunas modalidades, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, tal como de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 8,2.
- 40 La composición puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de isotonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. En algunas modalidades, la composición farmacéutica es una composición acuosa, es decir, una composición que comprende agua. Tal composición es típicamente una solución o una suspensión. En algunas modalidades de la invención, la composición farmacéutica es una solución acuosa. La expresión “composición acuosa” se define como una composición que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, la expresión “solución acuosa” se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua.
- 45 En algunas modalidades, la composición comprende un solvente orgánico no acuoso.
- En algunas modalidades, la composición farmacéutica es una composición liofilizada, a la que se añaden solventes y/o diluyentes antes del uso, por ejemplo, por el médico o el paciente.
- 50 En algunas modalidades, la composición farmacéutica es una composición seca (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

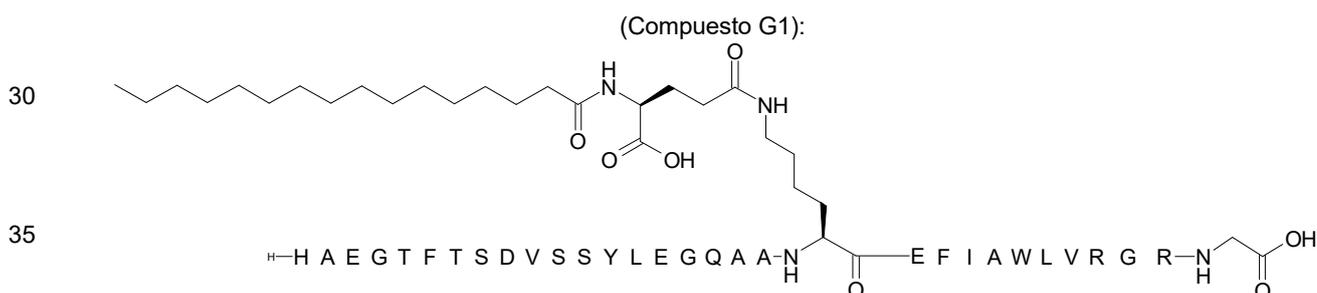
En algunas modalidades, la invención se refiere a una composición que comprende el derivado de la invención y uno o más ingredientes activos adicionales, tales como GLP-1, insulina o análogos y/o derivados de estos. En algunas modalidades, la invención se refiere a una composición que comprende el derivado de la invención y GLP-1 o análogos y/o derivados de estos. En algunas modalidades, la invención se refiere a una composición que comprende el derivado de la invención e insulina o análogos y/o derivados de estos. Una composición que comprende una combinación del derivado de la invención y uno o más otros ingredientes activos puede denominarse "coformulación". En algunas modalidades, tales coformulaciones son composiciones físicamente estables y/o químicamente estables.

El hecho de que los derivados de la invención puedan ser solubles a pH neutro, puede permitir una coformulación con insulina y permitir niveles más estables de glucosa en sangre y una cantidad reducida de episodios hipoglucémicos, así como también un menor riesgo de complicaciones relacionadas con la diabetes.

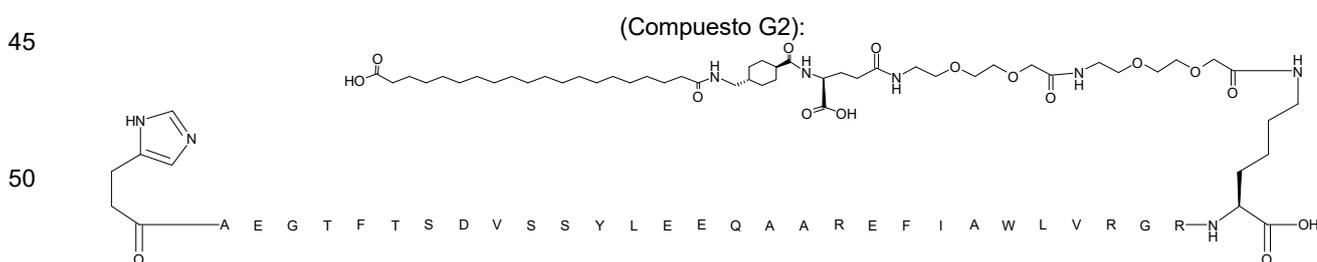
El término "excipiente", como se usa en la presente descripción, significa los compuestos químicos que se añaden normalmente a composiciones farmacéuticas, por ejemplo, tampones, agentes de tonicidad, conservantes y similares.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende, además, uno o más compuestos o sustancias terapéuticamente activos adicionales. En algunas modalidades, el compuesto terapéuticamente activo adicional es un compuesto de GLP-1 o un compuesto de insulina. En algunas modalidades, el compuesto terapéuticamente activo adicional es un compuesto de GLP-1. En algunas modalidades, el compuesto terapéuticamente activo adicional es un compuesto de insulina. En algunas modalidades, el compuesto GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en:

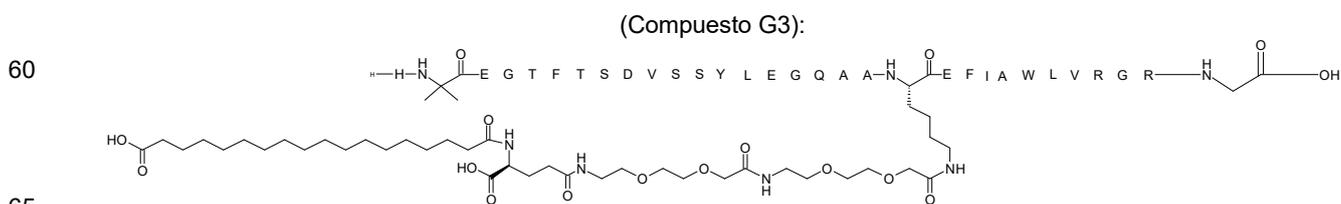
N-épsilon26-((S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butiril)[Arg34]GLP-1-(7-37)



;N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-({trans-4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Des aminoHis7,Glu22,Arg26,Arg34,Lys37]GLP-1-(7-37)

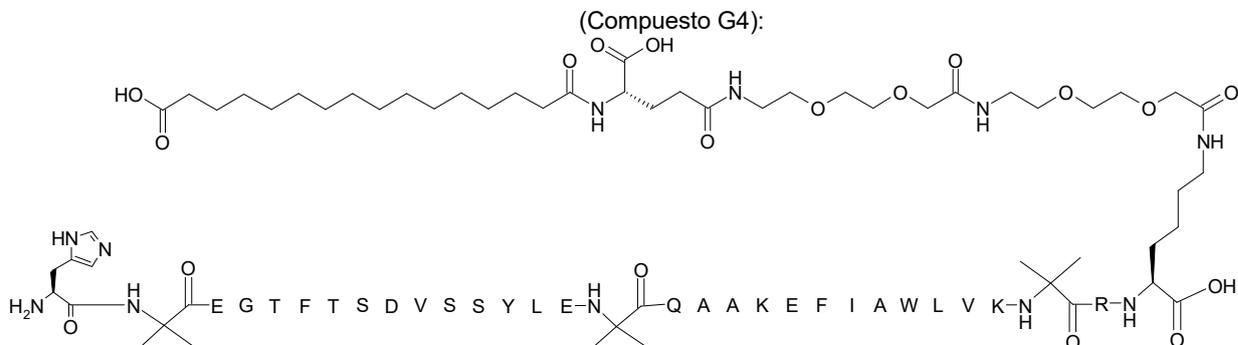


;N-épsilon26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)



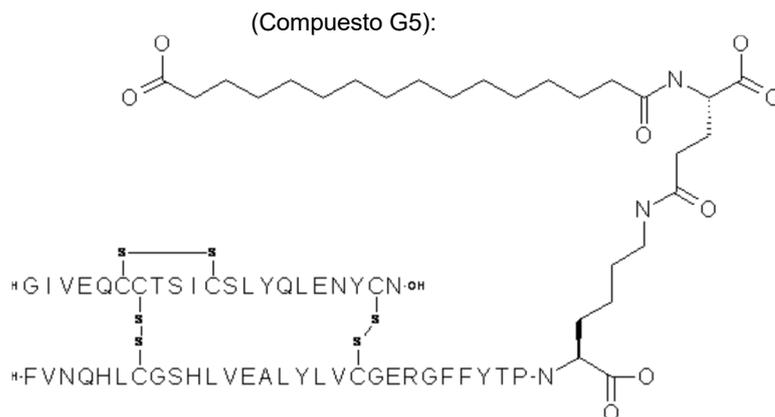
; y

N-épsilon37-[2-(2-{2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-butirilamino]-etoxi)-etoxi]-acetilamino]-etoxi)-etoxi)-acetil][Aib8,22,35,Lys37]GLP-1-(7-37)



; y sus sales, amidas, alquilos o ésteres farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, el compuesto de insulina es N-épsilon-B29-[(S)-4-Carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butiril] desB30 insulina humana



En algunas modalidades la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria que comprende de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg, tal como de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg, de un derivado de GLP-1 como se define en cualquiera de las modalidades anteriores.

En algunas modalidades la composición farmacéutica es adecuada para la administración parenteral.

Administración Farmacéutica

El derivado de la invención puede administrarse por vía parenteral a un paciente. La vía de administración del derivado puede ser intramuscular (IM), subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Se recomienda que un médico seleccione la dosificación de las composiciones que comprenden el derivado de esta invención que debe administrarse al paciente.

La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una lapicera. En algunas modalidades, las composiciones que comprenden el derivado de la invención pueden usarse en dispositivos tipo bolígrafo listos para el uso para la administración de glucagón. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. En algunas modalidades, las composiciones que comprenden el derivado de la invención pueden usarse en bombas para la administración de glucagón. La administración parenteral puede ser administración nasal. Como una opción adicional, las preparaciones de glucagón que comprenden el derivado de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosal, por ejemplo, bucal.

Una dosificación típica de un derivado o composición de la invención cuando se emplea en un método de acuerdo con la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por

día, preferentemente, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,02 mg/kg de peso corporal. Como se describió anteriormente, los derivados de la invención pueden administrarse o aplicarse en combinación con uno o más compuestos o sustancias terapéuticamente activos adicionales, y pueden seleccionarse compuestos o sustancias adicionales adecuados, por ejemplo, de agentes antidiabéticos, agentes antihiperlipidémicos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y agentes para el tratamiento de complicaciones que resultan de, o se asocian con, la diabetes.

Los agentes antidiabéticos adecuados incluyen insulina, derivados o análogos de insulina, derivados o análogos de GLP-1 (péptido similar a glucagón-1) [tales como los descritos en el documento WO 98/08871 (Novo Nordisk A/S) u otros análogos de GLP-1 tales como exenatida (Byetta, Eli Lilly/Amilina; AVE0010, Sanofi-Aventis), taspoglútilo (Roche), albiglútilo (Syncria, GlaxoSmithKline)], dulaglutida (Trulicity, Eli Lilly)], amilina, análogos de amilina (por ejemplo, Symlin/Pramlintida) así como también agentes hipoglucémicos activos por vía oral.

En el caso de la administración de un derivado de GLP-1 de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más compuestos o sustancias terapéuticamente activas adicionales como se describen anteriormente, para un propósito relacionado con el tratamiento o prevención de la obesidad o sobrepeso, es decir, relacionado con la reducción o la prevención del exceso de adiposidad, puede ser relevante emplear tal administración en combinación con la intervención quirúrgica para el propósito de lograr la pérdida de peso o prevenir la ganancia de peso, por ejemplo, en combinación con la intervención quirúrgica bariátrica. Los ejemplos de técnicas quirúrgicas bariátricas usadas frecuentemente incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: gastroplastia vertical con bandas (también conocida como “grapado de estómago”), en donde una parte del estómago se grapa para crear una bolsa preestomacal más pequeña que sirve como un nuevo estómago; bandas gástricas, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de banda gástrica ajustable (tal como la *Banda Gástrica Ajustable Sueca* (SAGB), el *LAP-BAND™* o el *MIDBanda™*), en donde se crea una pequeña bolsa preestomacal que sirve como un nuevo estómago mediante el uso de una banda elastomérica (por ejemplo, silicona) que puede ajustarse en tamaño por el paciente; y la cirugía de derivación gástrica, por ejemplo, derivación “en Y de Roux”, en donde se crea una pequeña bolsa de estómago mediante el uso de un dispositivo grapador y se conecta al intestino delgado distal, donde la parte superior del intestino delgado se une nuevamente en una configuración en forma de Y.

La administración de un derivado de GLP-1 de la invención (opcionalmente en combinación con uno o más compuestos o sustancias terapéuticamente activas adicionales como se describió anteriormente) puede tener lugar durante un período antes de llevar a cabo la intervención quirúrgica bariátrica en cuestión y/o durante un período de tiempo posterior a esta. En muchos casos, puede preferirse comenzar la administración de un compuesto de la invención después que ha tenido lugar la intervención quirúrgica bariátrica.

Los derivados de GLP-1 de la presente invención y los agentes antiobesidad o antidiabetes, como se define en la presente descripción, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. Los factores pueden suministrarse en forma de dosificación única en donde la forma de dosificación única comprende ambos compuestos, o en forma de un kit de partes que comprende una preparación de un derivado de GLP-1 de la presente invención como una primera forma de dosificación unitaria y una preparación de agentes antiobesidad o antidiabetes como una segunda forma de dosificación unitaria. Cuando se menciona una primera o segunda o tercera, etcétera, dosis unitaria a lo largo de esta descripción esto no indica el orden de administración preferido, sino que se hace simplemente por propósitos de conveniencia.

Por dosificación “simultánea” de una preparación de un derivado de GLP-1 de la presente invención y de una preparación de agentes antiobesidad o antidiabetes se entiende la administración de los compuestos en forma de dosificación única, o la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación temporal de no más de 15 minutos, preferentemente, 10, con mayor preferencia, 5, con mayor preferencia, 2 minutos. Cualquiera de los factores puede administrarse primero.

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

Como ya se indicó, en todos los métodos o indicaciones terapéuticas descritas anteriormente, un derivado de GLP-1 de la presente invención puede administrarse solo. Sin embargo, también puede administrarse en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos adicionales, ya sea secuencialmente o en paralelo.

Una dosificación típica de un compuesto de la invención, por ejemplo, un derivado de GLP-1, cuando se emplea en un método de acuerdo con presente la invención, está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, con mayor preferencia, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por

día administrado en una o más dosis, tal como de 1 a 3 dosis. La dosis exacta dependerá de la frecuencia y el modo de administración, el sexo, la edad, el peso y el estado general del sujeto que se trata, la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata, cualesquiera enfermedades concomitantes a tratar y otros factores evidentes para los expertos en la técnica.

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

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

Indicaciones Farmacéuticas

En algunas modalidades, la invención se refiere al derivado de GLP-1, como se define en la presente descripción para su uso en medicina, opcionalmente en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos adicionales.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "cantidad eficaz terapéuticamente" de un compuesto, por ejemplo, un derivado de GLP-1, se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar, o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad eficaz terapéuticamente". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como también del peso y estado general del sujeto. Debe entenderse que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse mediante el uso de la experimentación rutinaria, mediante la construcción de una matriz de valores y la evaluación de diferentes puntos en la matriz, todo lo cual está dentro del nivel de experticia de un médico o veterinario entrenado.

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

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que provocan hiperglucemia. El término se usa para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del cuerpo no responden adecuadamente a la insulina, lo que impide, por lo tanto, que las células absorban glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

La diabetes tipo 1, también llamada diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y diabetes de comienzo juvenil, la provoca la destrucción de las células beta, lo que conduce usualmente a una deficiencia absoluta de insulina.

La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) y diabetes de comienzo en el adulto, se asocia con la resistencia predominante a la insulina y, por lo tanto, con la deficiencia relativa de insulina y/o con un defecto predominantemente en la secreción de insulina con resistencia a la insulina.

El término "euglucemia" como se usa en la presente descripción significa una concentración normal de glucosa en sangre. También se llama normoglucemia.

El término "obesidad" implica un exceso de tejido adiposo. Cuando el consumo de energía supera el gasto de energía, el exceso de calorías se almacena en el tejido adiposo, y si este equilibrio positivo neto se prolonga, produce obesidad, es decir, existen dos componentes en el balance de peso, y una anomalía en uno de los lados (consumo o gasto) puede conducir a la obesidad. En este contexto, la obesidad se ve mejor como cualquier grado de exceso de tejido adiposo que imparte un riesgo de salud. La distinción entre individuos normales y obesos solo puede aproximarse, pero el riesgo de salud impartido por la obesidad es probablemente una continuidad del

aumento del tejido adiposo. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los individuos con un índice de masa corporal (BMI = peso corporal en kilogramos dividido entre el cuadrado de la altura en metros) por encima de 25 deben considerarse obesos.

5 En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la obesidad o la prevención del sobrepeso. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en la disminución de la ingestión de alimentos. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el aumento del gasto de energía. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en la reducción del peso corporal. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en la regulación del apetito. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en la inducción de saciedad. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en la prevención de la recuperación del peso después de una pérdida de peso exitosa. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de una enfermedad o estado relacionado con el sobrepeso o la obesidad. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la bulimia. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la sobreingestión compulsiva.

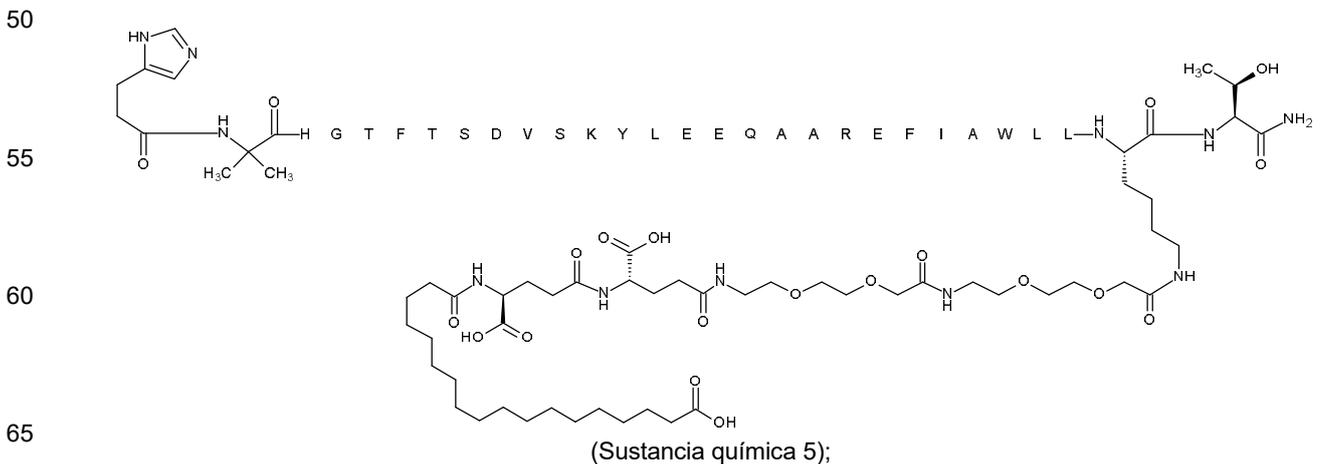
En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la hipertensión. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la dislipidemia. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad coronaria. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento de la tolerancia a la glucosa alterada. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el retraso o prevención de la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el retraso de la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a la diabetes tipo 2. En algunas modalidades, la invención se refiere a un derivado de GLP-1 como se define en la presente descripción para su uso en el retraso de la progresión de la diabetes tipo 2 a la diabetes que requiere insulina.

Modalidades

Entre las modalidades adicionales están las siguientes:

45 1. Un derivado de GLP-1 caracterizado por tener la fórmula: amida de N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



2. Una composición farmacéutica que comprende el derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 3. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la modalidad 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de obesidad, hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, y/o diabetes tipo 1.

Ejemplos

10 La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención como se reivindica.

Lista de abreviaturas

15	BOC:	terc-butiloxycarbonilo
	DCM:	Diclorometano
	DIC:	Diisopropilcarbodiimida
20	Fmoc:	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
	HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol
	HOAt:	1-hidroxí-7-azabenzotriazol
25	HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	LCMS:	Cromatografía líquida Espectrometría de masas
30	MeCN:	Acetonitrilo
	Mtt:	4-Metiltrilito
	NMP:	N-metil pirrolidona
35	Oxima Pura:	Éster etílico de ácido ciano-hidroxiimino-acético
	Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuran-5-sulfonilo
40	RP:	Fase inversa
	RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
45	RT:	Temperatura ambiente
	Rt:	Tiempo de retención
	SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
50	TFA:	Ácido trifluoroacético
	TIPS:	Triisopropilsilano
	Trt	Tritilo
55	UPLC:	Cromatografía líquida de ultraeficacia
	10EE:	10 a la potencia (por ejemplo, "10EE(X)" se refiere al número 10 a la potencia (X), o simplemente el número $10^{(X)}$, es decir, 5×10^{EE3} es 5×10^3)
60		

Métodos generales

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

Los compuestos en los Ejemplos 1-42 en la presente descripción se prepararon, purificaron y analizaron esencialmente de acuerdo con los procedimientos generales descritos a continuación.

Métodos generales de SPPS

Los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc usados fueron el estándar recomendado: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Lys(Mtt)-OH o Fmoc-Lys(Alloc)-OH suministrados por, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o NovabioChem. El Imp del terminal N se incorporó mediante el uso de ácido 3-(N-1-Tritil-imidazol-4-il)-propiónico.

La introducción del sustituyente en el nitrógeno épsilon de una Lisina se logró mediante el uso de una Lisina protegida con Mtt (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) o Alloc (Fmoc-Lys(Alloc)-OH). Para la introducción del sustituyente se usaron bloques de construcción protegidos adecuadamente tales como ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, Fmoc-Glu-OtBu, así como también los aminoácidos estándar protegidos descritos anteriormente. La introducción del resto de ácido graso se logró mediante el uso de un diácido mono terc-butilado tal como ácido 18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoico.

La SPPS se realizó en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 U.S.A.) a escala de 100 o 250 μ mol. Se usó resina de poliestireno Rink Amide AM (Novabiochem, carga, por ejemplo, 0,62 nmol/g) o resina Wang precargada (por ejemplo, Novabiochem) como el soporte sólido. La desprotección de Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina al 20 % en NMP. El acoplamiento se realizó mediante el uso de un exceso, en comparación con la resina de una mezcla de aminoácidos/Oxyma Pure®/DIC/colidina (escala de 100 μ mol: 10:9:9:9; escala de 250 μ mol: 7:6:6:6) en NMP. Alternativamente, puede usarse DEPBT (3-(dietoxifosforilo)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona)/DIPEA para la supresión de la epimerización de, por ejemplo His durante el acoplamiento. Se realizaron lavados superiores con NMP y DCM (5-7 ml, 0,5 min, 2 x 2 cada uno) entre las etapas de desprotección y acoplamiento. Los tiempos de acoplamiento fueron típicamente de 60 minutos. Algunos aminoácidos incluyen, pero no se limita a, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Aib-OH o Boc-His(Trt)-OH, así como también los componentes principales que comprenden al sustituyente se "acoplaron doblemente", lo que significa que después del primer acoplamiento (por ejemplo, 60 min), la resina se drenó y se añaden más reactivos (aminoácido, (HOAt u Oxyma Pure®), DIC y colidina), y la mezcla se deja reaccionar de nuevo (por ejemplo, 60 minutos).

Si se usa Fmoc-Lys(Mtt)-OH, el grupo Mtt se eliminó mediante el lavado de la resina con HFIP/DCM (75:25) (2 x 2 min), se lavó con DCM y se suspendió la resina en HFIP/DCM (75:25)(2 x 20 min) y se lavó posteriormente en secuencia con piperidina/NMP (20:80), DCM(1x), NMP(1x), DCM(1x), NMP(1x).

Si se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH, el grupo Alloc puede eliminarse al tratar la resina con Pd(PPh₃)₄ (0,02 equiv) en presencia de uno o más depuradores en combinación, por ejemplo, morfolina (6,0 equiv) y/o complejo de dimetil borano (18,0 equiv) (30 min). La resina se lava después con MeOH, NMP o DMF e IPA (alcohol isopropílico), respectivamente, antes de que el sustituyente pueda introducirse en la posición épsilon del resto de lisina.

Escisión de la resina

Después de la síntesis la resina se lavó con DCM y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIPS/agua (95/2,5/2,5) o TFA/EDT (1,2-etanoditol)/agua (90/5/5) seguido de precipitación con Et₂O (éter dietílico) o IPE (éter diisopropílico). El precipitado se lavó con el solvente usado.

Purificación y cuantificación

El péptido bruto se disolvió en una mezcla adecuada de agua y MeCN tal como agua/MeCN (4:1) o agua/AcOH (1:1) a 60 °C durante 1 hora y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Waters Deltaprep 4000 o Gilson) en una columna que comprendía gel de sílice C8 o C18. La elución se realizó con un gradiente creciente de MeCN en agua que comprendía TFA al 0,1 %. Las fracciones relevantes se revisan mediante HPLC analítica o UPLC. Las fracciones que comprendían el péptido diana puro se agruparon y se concentraron a presión reducida. Puede introducirse una etapa de purificación adicional mediante el uso de otro gradiente, por ejemplo, que contiene NH₄HCO₃ 0,05 M. La solución resultante se analizó (HPLC, LCMS) y el producto se cuantificó mediante el uso de un detector de quimioluminiscencia específico para nitrógeno de HPLC (Antek 8060 HPLC-CLND) o mediante la medición de la absorción UV a 280 nm. El producto se dispensa en viales de vidrio. Los frascos se taponaron con prefiltrados de fibra de vidrio Millipore. La liofilización proporciona el trifluoroacetato péptido como un sólido blanco.

El trifluoroacetato de péptido puede cambiarse a la sal de sodio mediante intercambio iónico en columna, por ejemplo, con NaOAc en MeCN. Alternativamente, el trifluoroacetato de péptido puede cambiarse a la sal de amonio mediante cromatografía en columna, por ejemplo, con un gradiente que contiene NH₄HCO₃ 0,05 M, seguido de liofilización y suspensión en agua. El péptido se cambió a la sal de sodio mediante la adición de NaOH 1 M

ES 2 805 326 T3

(equivalente de acuerdo con los residuos básicos/ácidos), volviendo la suspensión transparente. Finalmente, la sal de sodio del péptido puede aislarse mediante liofilización.

Métodos para detección y caracterización

5

Métodos de LCMS

Método: LCMS01

10	Sistema	Sistema de LC: Waters Acquity UPLC Columna: : Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm. Detector: : Waters (Micromass) LCT Premier XE
15	Configuración del detector	Método de ionización: ES Intervalo de barrido: 500 – 2000 amu Modo de funcionamiento: Modo W positivo/negativo : modo positivo Voltaje del Cono: 50 V Tiempo de barrido 1,0 s
20	Condiciones	Gradiente lineal: B 5 % a 95 % Tiempo de ejecución del gradiente: 4,0 minutos Tiempo de ejecución total: 7,0 minutos Tasa de flujo: 0.4 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C
25	Eluyentes	Solvente A: agua MQ al 99,90 %, ácido fórmico al 0,1 % Solvente B: acetonitrilo al 99,90 %, ácido fórmico al 0,1 % Solvente C: NA
30	Descripción y validación de resultados	Masa encontrada es la masa encontrada del compuesto M/z encontrada es el ion molecular encontrado ((M+z)/z) del compuesto La masa calculada es el peso molecular del compuesto deseado

Método: LCMS13

35	Sistema	Sistema: Waters Acquity UPLC SQD 2000 Columna: Acquity UPLC BEH 1.7 µ C18 100 Å 2.1 x 100 mm Detector: UV: PDA, SQD 2000
40	Configuración del detector	Método de ionización: ES+ Intervalo de barrido: 500-2000 Voltaje del Cono: 60 V Tiempo de barrido 0,5
45	Condiciones	Gradiente lineal: B 10 % a 90 % Tiempo de ejecución del gradiente: 3 min Tiempo de ejecución total: 4 min tasa de flujo: 0,3 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C PDA: 210-400 nm
50	Eluyentes	Solvente A: H2O al 99,90 %, TFA al 0,1 % Solvente B: CH3CN al 99,90 %, TFA al 0,1 % Solvente C: NA
55	Descripción y validación de resultados	Masa encontrada es la masa encontrada del compuesto M/z encontrada es el ion molecular encontrado ((M+z)/z) del compuesto La masa calculada es el peso molecular del compuesto deseado

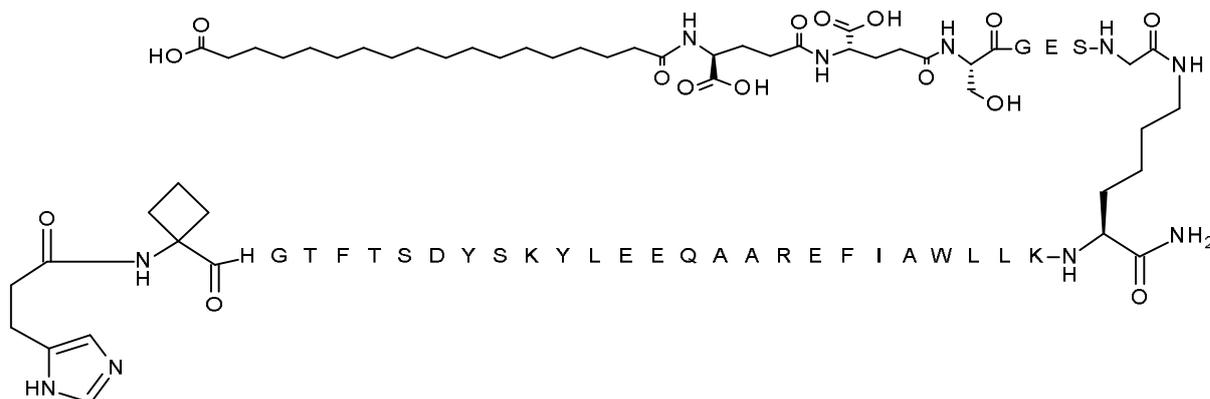
Métodos de UPLC

Método: UPLC02

Sistema	Sistema: Sistema Waters Acquity UPLC Columna: Columna ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 um, 2,1 x 150 mm Detectores: Detector TUV Waters Acquity
Configuración del detector	214 nm y 254 nm
Condiciones	Gradiente lineal: B al 5 % a 95 % Tiempo de ejecución del gradiente: 16 minutos Tasa de flujo: fijada a 0,40 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C
Eluyentes	Solvente A: Agua al 99,95 %, Ácido trifluoroacético al 0,05 % Solvente B: Acetonitrilo al 99,95 %, Ácido trifluoroacético al 0,05 %

Ejemplo 1

amida de N^ε35-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



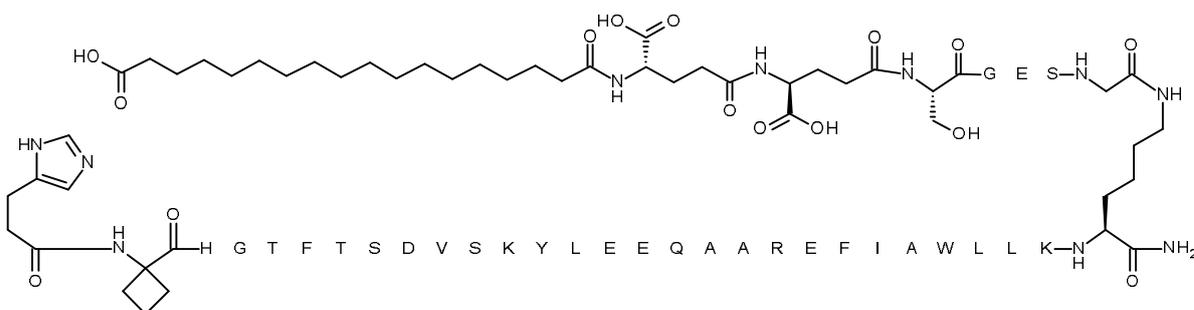
(Sustancia química 1)

UPLC02: Rt = 8,7 min

LCMS01: Calc m/1 = 4423; Encontrado m/3 = 1475; Encontrado m/4 = 1107; Encontrado m/5 = 886

Ejemplo 2

amida de N^ε35-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



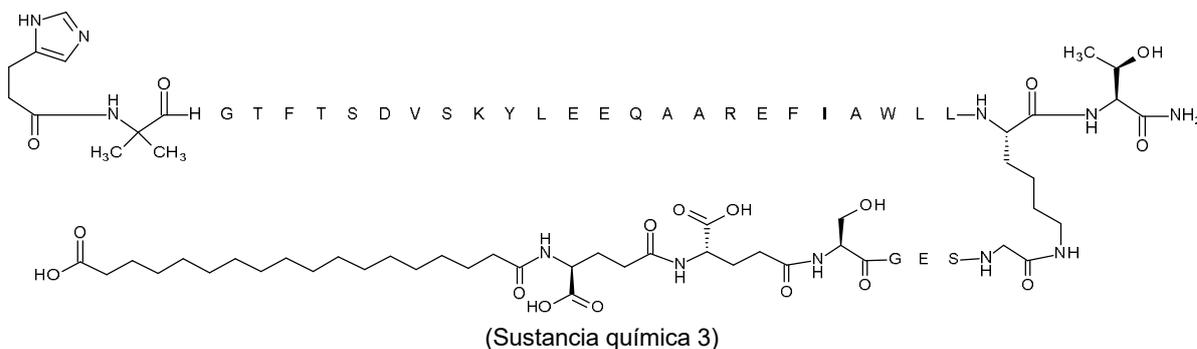
(Sustancia química 2)

UPLC02: Rt = 8,3

LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4359; Encontrado m/1 = 4359; Encontrado m/3 = 1453; Encontrado m/4 = 1091; Encontrado m/5 = 873

Ejemplo 3

amida de N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido

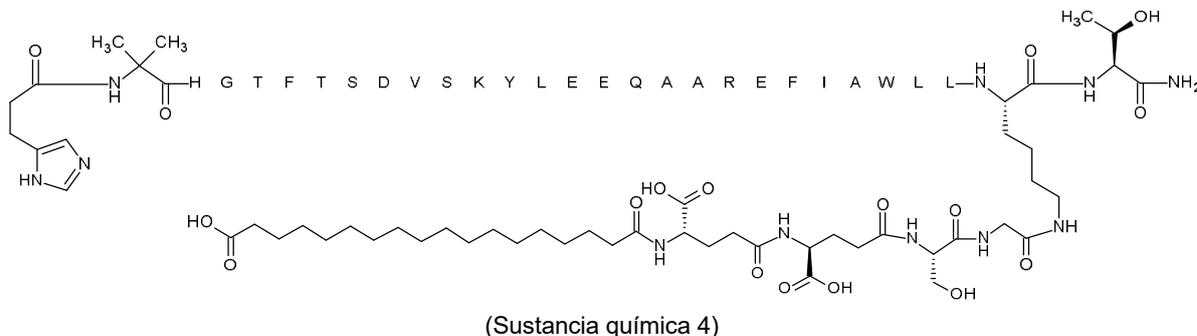


UPLC02: Rt= 8,8 min

LCMS01: Rt = 2,3 minutos; Calc m/1 = 4320; Encontrado m/1 = 4320; Encontrado m/3 = 1441; Encontrado m/4 = 1081; Encontrado m/5 = 865

Ejemplo 4

amida de N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido

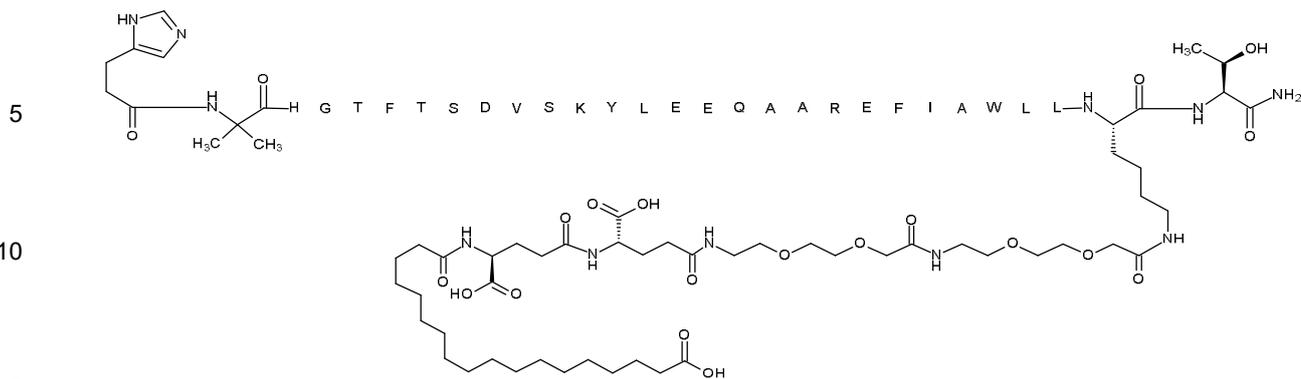


UPLC02: Rt = 9,1 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4046; Encontrado m/3 = 1350; Encontrado m/4 = 1012; Encontrado m/5 = 810; Encontrado m/z = 4047;

Ejemplo 5

amida de N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



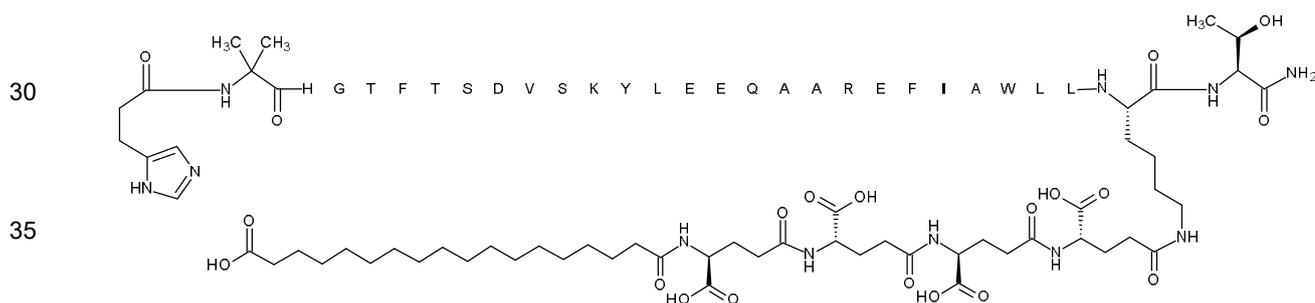
UPLC02: Rt = 9,0 min

(Sustancia química 5)

LCMS01: RT = 2,3 min; Calc m/1 = 4193; Encontrado m/3 = 1398; Encontrado m/4 = 1049; Encontrado m/5 = 839; Encontrado m/z = 4193;

Ejemplo 6

amida de N^{ε34}-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17)-carboxiheptadecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



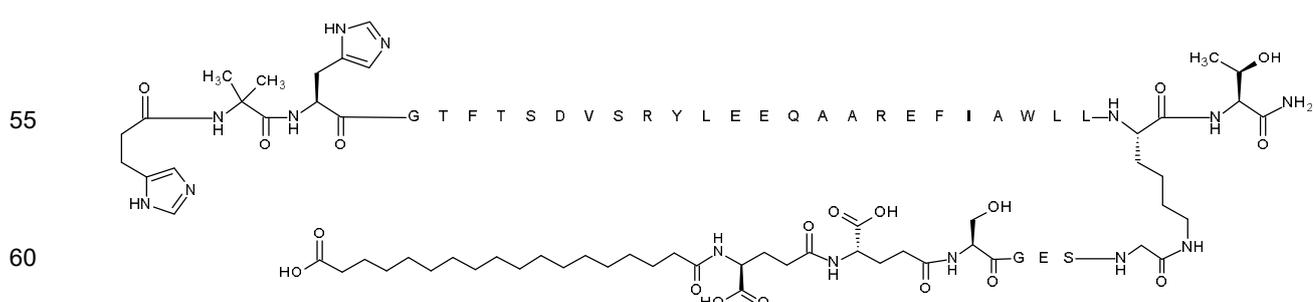
(Sustancia química 6)

UPLC02: Rt = 9,0 min

LCMS01: RT = 2,3 min; Calc m/1 = 4161; Encontrado m/3 = 1388; Encontrado m/4 = 1041; Encontrado m/5 = 833; Encontrado m/z = 4162

Ejemplo 7

amida de N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17)-carboxiheptadecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxipropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxipropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



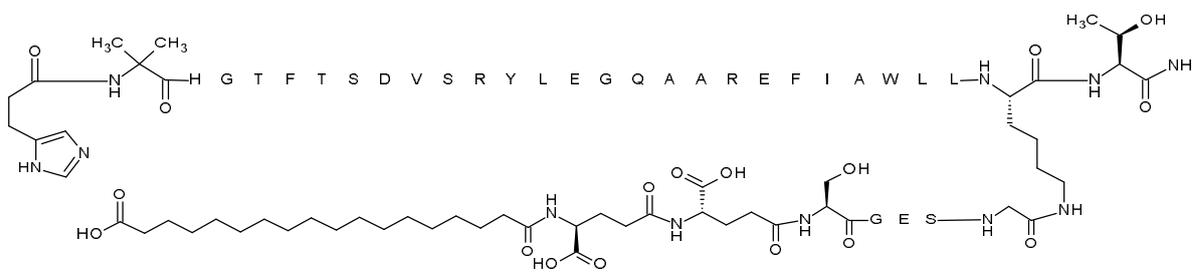
(Sustancia química 7)

UPLC02: Rt = 8,9 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4348; Encontrado m/1 = 4348; Encontrado m/3 = 1449; Encontrado m/4 = 1087; Encontrado m/5 = 870

Ejemplo 8

amida de N^{E34} -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



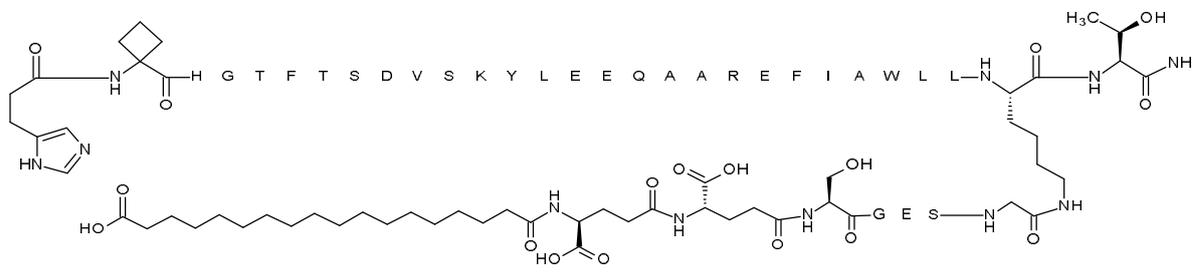
(Sustancia química 8)

UPLC02: Rt = 9,0 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4276; Encontrado m/1 = 4276; Encontrado m/3 = 1426; Encontrado m/4 = 1070; Encontrado m/5 = 856

Ejemplo 9

amida de N^{E34} -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Acb8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



(Sustancia química 9)

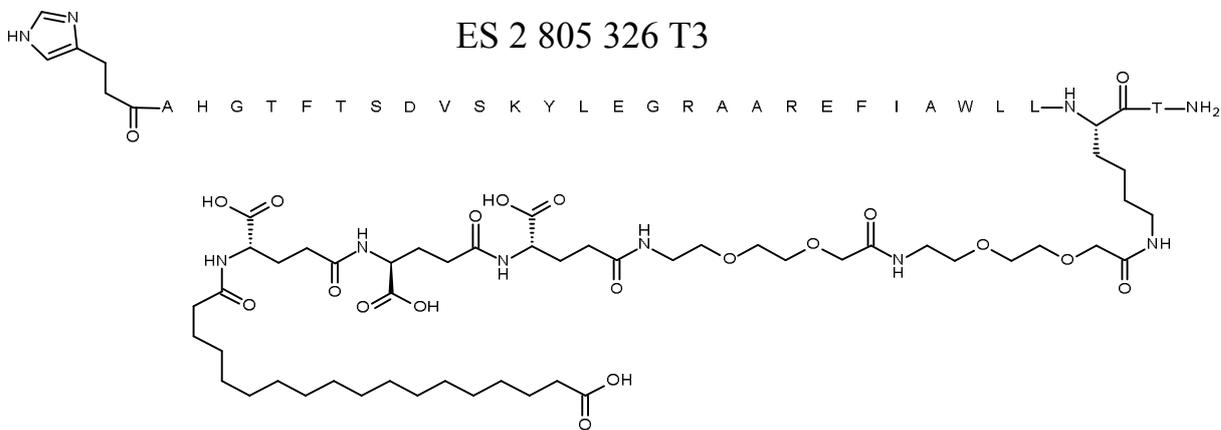
UPLC02: Rt = 8,9 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4332; Encontrado m/1 = 4332; Encontrado m/3 = 1445; Encontrado m/4 = 1084; Encontrado m/5 = 867

Ejemplo 10

amida de N^{E34} -[2-[[2-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

ES 2 805 326 T3



5

10 UPLC02: Rt = 8,6 min

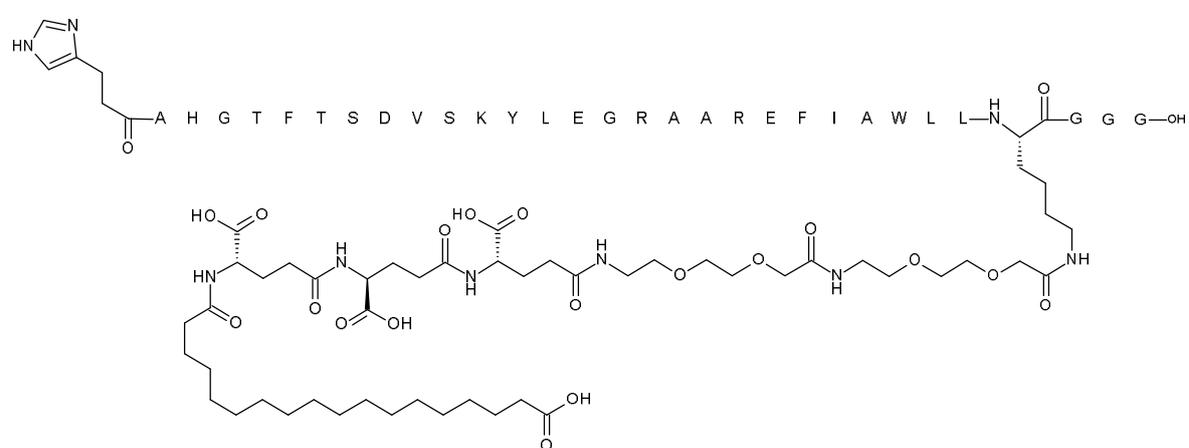
LCMS13: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4264; Encontrado m/3 = 1422; Encontrado m/4 = 1067

Ejemplo 11

15

N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-péptido

20



25

30

35

(Sustancia química 11)

40 UPLC02: Rt = 8,7 min

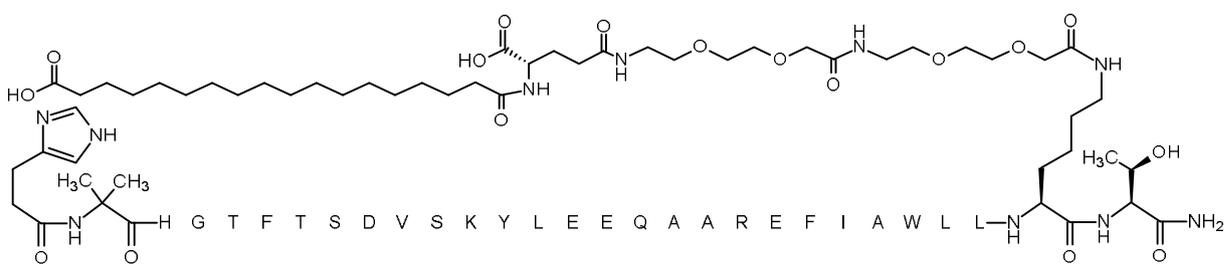
LCMS13: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4335; Encontrado m/3 = 1445; Encontrado m/4 = 1084

Ejemplo 12

45

amida de N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido

50



55

60

(Sustancia química 12)

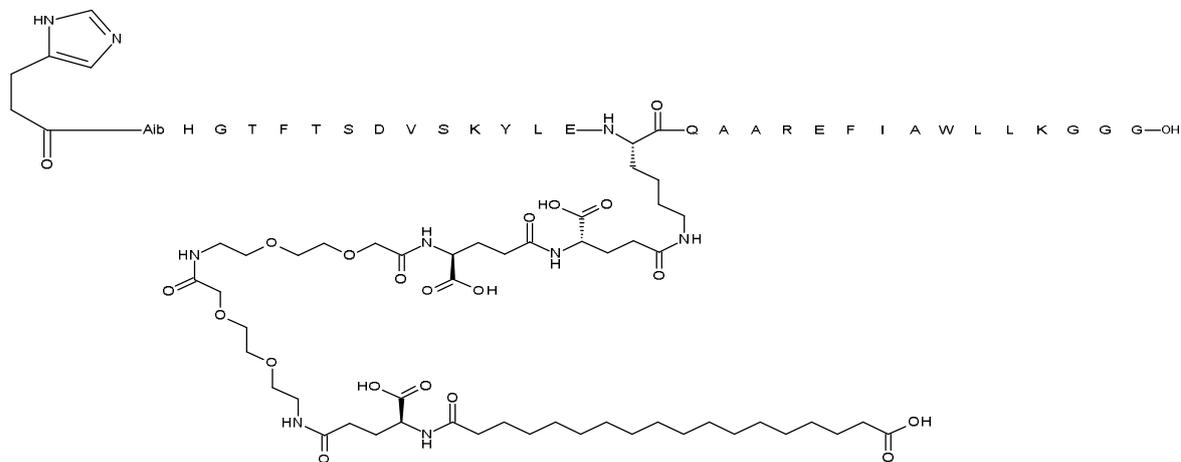
UPLC02: Rt = 9,3 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4064; Encontrado m/1 = 4064; Encontrado m/3 = 1356; Encontrado m/4 = 1017

65

Ejemplo 13

N^{ε22}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Gly36]-GLP-1-(7-37)-péptido



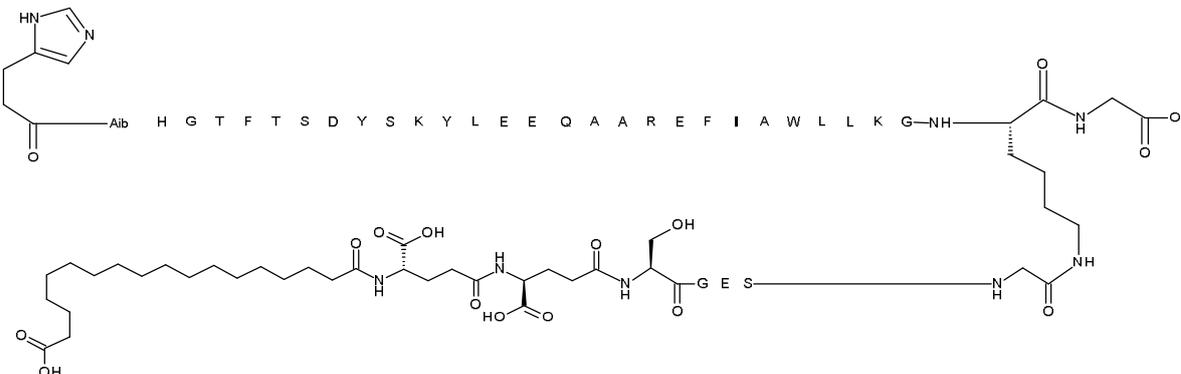
(Sustancia química 13)

UPLC02: Rt = 8,4 min

LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4392; Encontrado m/1 = 4392; Encontrado m/3 = 1465; Encontrado m/4 = 1099

Ejemplo 14

N^{ε36}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys36]-GLP-1-(7-37)-péptido



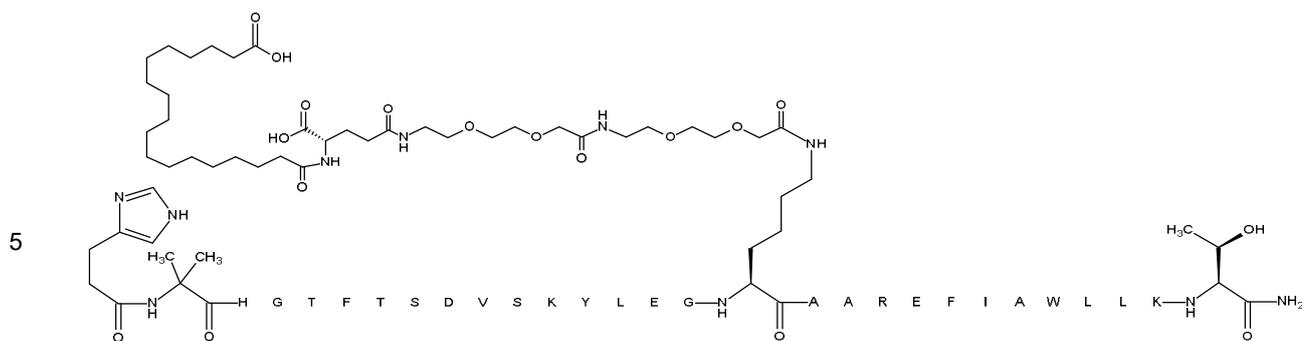
(Sustancia química 14)

UPLC02: Rt = 8,2 min

LCMS01: Rt = 2,1 min; Calc m/1 = 4526; Encontrado m/1 = 4526; Encontrado m/3 = 1510; Encontrado m/4 = 1133

Ejemplo 15

amida de N^{ε23}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

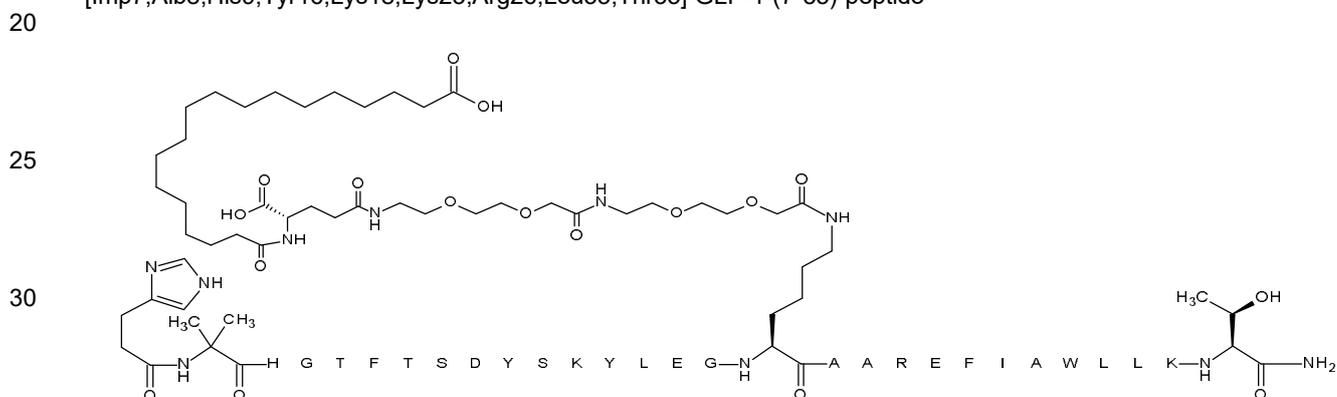


UPLC02: Rt = 8,8 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 3992; Encontrado m/1 = 3992; Encontrado m/3 = 1332; Encontrado m/4 = 999

15 **Ejemplo 16**

amida de N^ε23-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo-[Imp7,Aib8,His9,Tyr16,Lys18,Lys23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



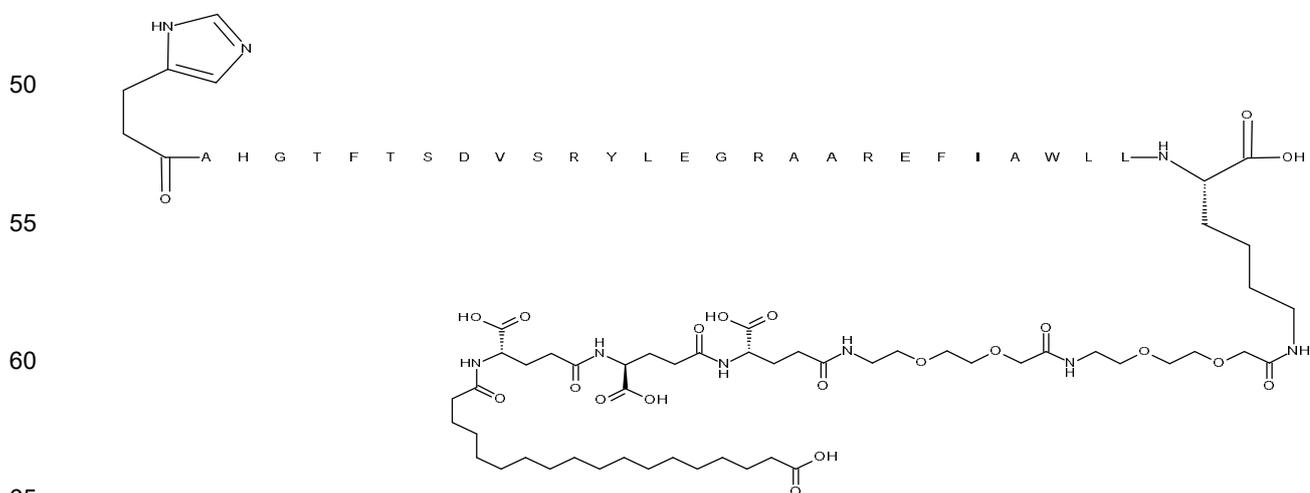
(Sustancia química 16)

UPLC02: Rt = 8,6 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4056; Encontrado m/1 = 4055; Encontrado m/3 = 1353; Encontrado m/4 = 1015

40 **Ejemplo 17**

N^ε34-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-[[4S]-4-carboxi-4-[[4S]-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33]-GLP-1-(7-34)-peptido



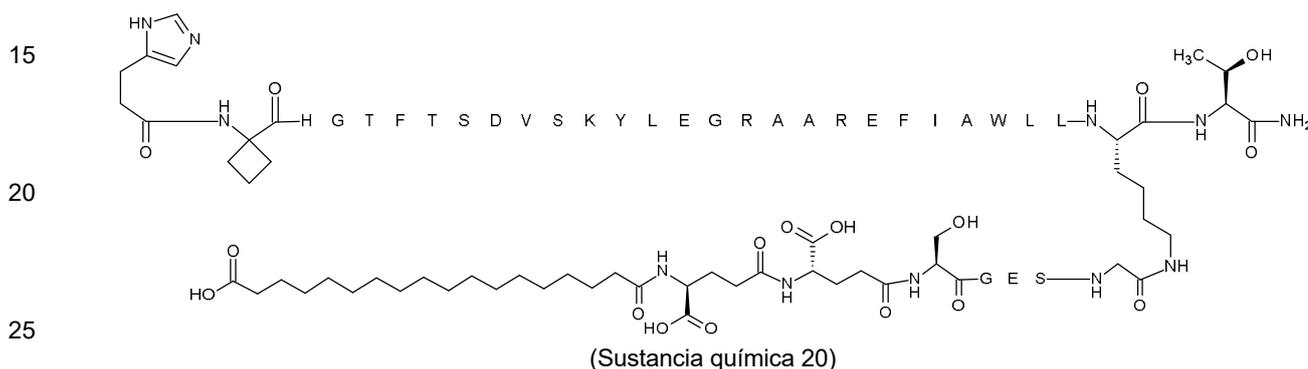
(Sustancia química 17)

UPLC02: Rt = 8,7 min

5 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4277; Encontrado m/3 = 1426; Encontrado m/4 = 1070; Encontrado m/5 = 856

Ejemplo 20

10 amida de N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Ac8,His9,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

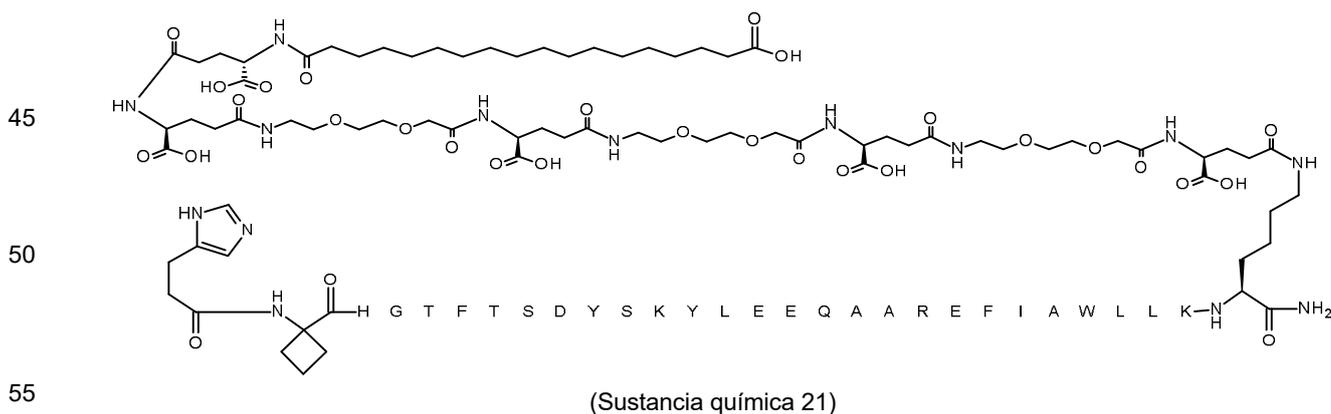


UPLC02: Rt = 8,6 min

30 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4287,88; Encontrado m/1 = 4290; Encontrado m/3 = 1430; Encontrado m/4 = 1073; Encontrado m/5 = 858

Ejemplo 21

35 amida de N^{ε35}-[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Imp7,Ac8,His9,Tyr16,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



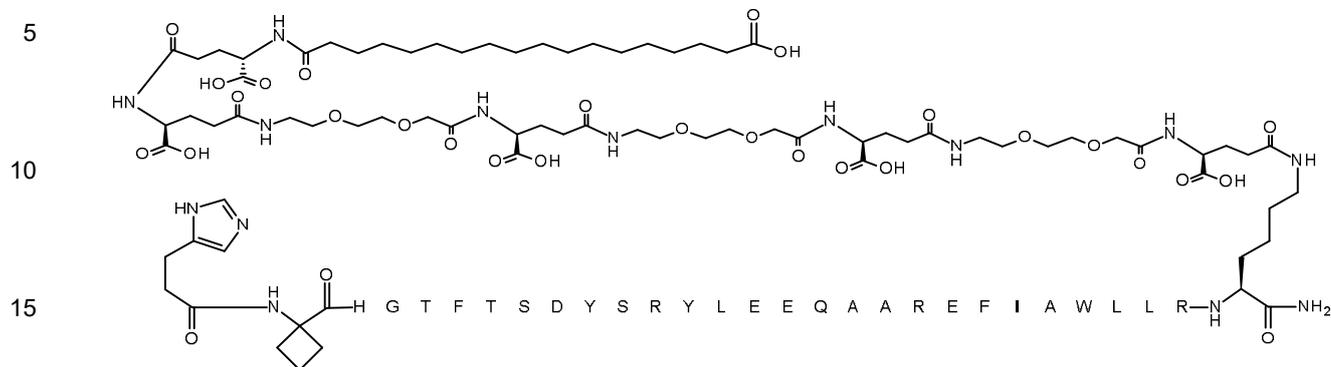
UPLC02: Rt = 8,5 min

60 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4829; Encontrado m/3 = 1610; Encontrado m/4 = 1208; Encontrado m/5 = 966

Ejemplo 22

65 amida de N^{ε35}-[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[[2-[[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]a

mino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-
[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



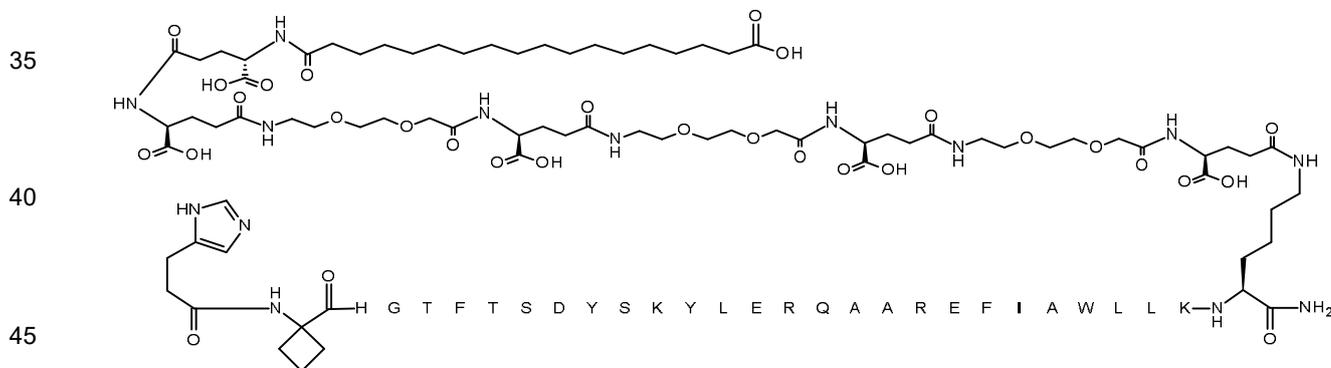
(Sustancia química 22)

20 UPLC02: Rt = 8,5 min

LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4884; Encontrado m/4 = 1222; Encontrado m/5 = 978; Encontrado m/z = 4885

25 **Ejemplo 23**

amida de N^ε35-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido

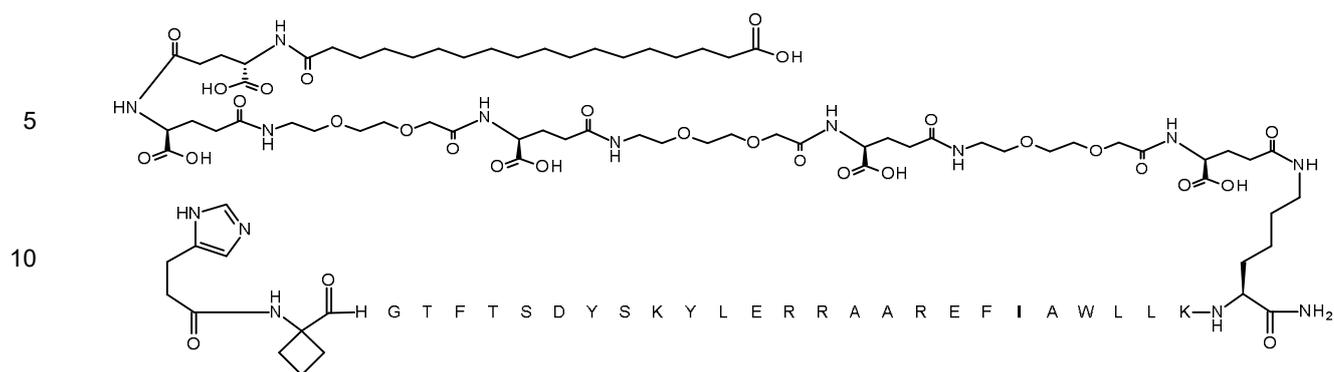


(Sustancia química 23)

50 LCMS01: Rt = 2,1 min; Calc m/1 = 4855; Encontrado m/4 = 1215; Encontrado m/5 = 972; Encontrado m/z = 4856

55 **Ejemplo 24**

amida de N^ε35-[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg22,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



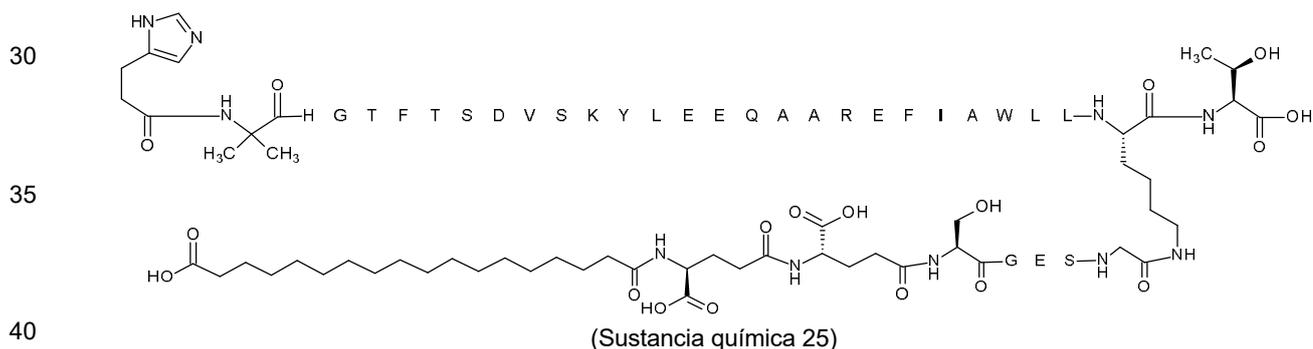
(Sustancia química 24)

UPLC02: Rt = 8,0 min

20 LCMS01: Rt = 2,1 min; Calc m/1 = 4884; Encontrado m/3 = 1629; Encontrado m/4 = 1222; Encontrado m/5 = 978

Ejemplo 25

25 N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido



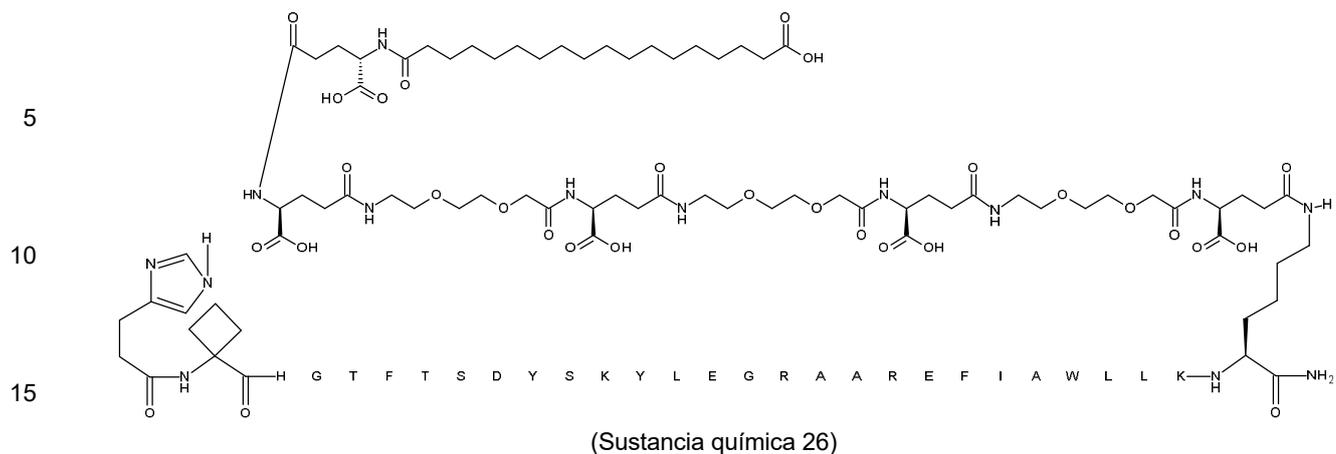
(Sustancia química 25)

UPLC02: Rt = 9,0 min

45 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4321; Encontrado m/3 = 1441; Encontrado m/4 = 1081; Encontrado m/5 = 865

Ejemplo 26

50 amida de N^{ε35}-[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Lys18,Arg23,Arg26,Leu33,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido

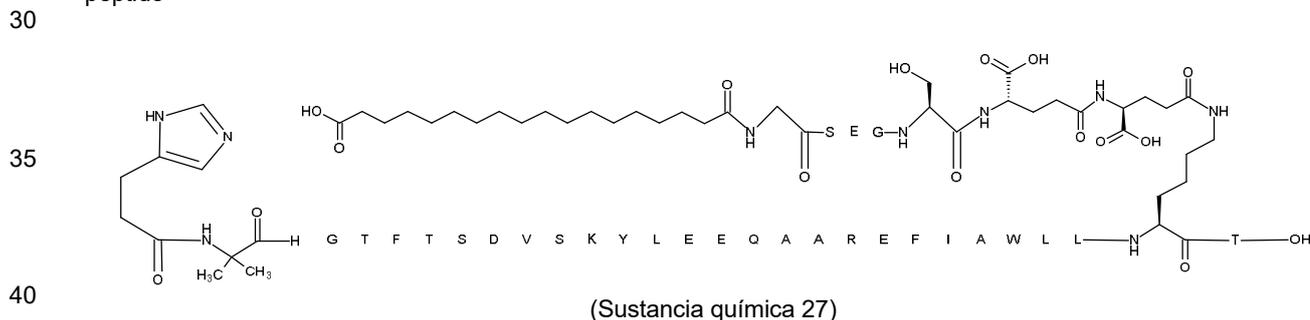


UPLC02: Rt = 8,1 min

20 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4784; Encontrado m/3 = 1596; Encontrado m/4 = 1197; Encontrado m/5 = 958; Encontrado m/z = 4785

Ejemplo 27

25 $N^{\epsilon 34}$ -[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[[[(2S)-2-[[2-(17-carboxiheptadecanoilamino)acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]butanoil]amino]acetil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]butanoil]amino]butanoilo]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido

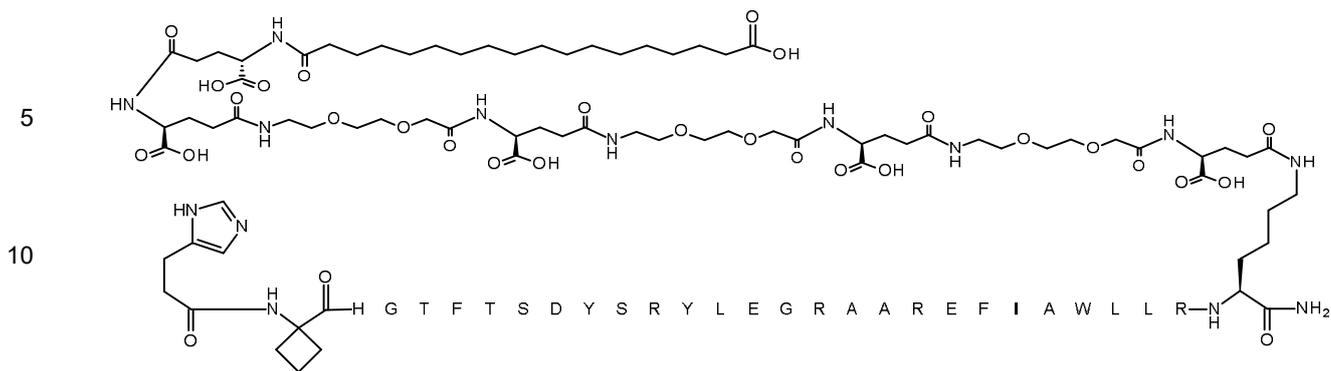


UPLC02: Rt = 9,06 min

45 LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4321; Encontrado m/3 = 1441; Encontrado m/4 = 1081, Encontrado m/5 = 865

Ejemplo 28

50 amida de $N^{\epsilon 35}$ -[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]-[Imp7,Acb8,His9,Tyr16,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Arg34,Lys35]-GLP-1-(7-35)-péptido



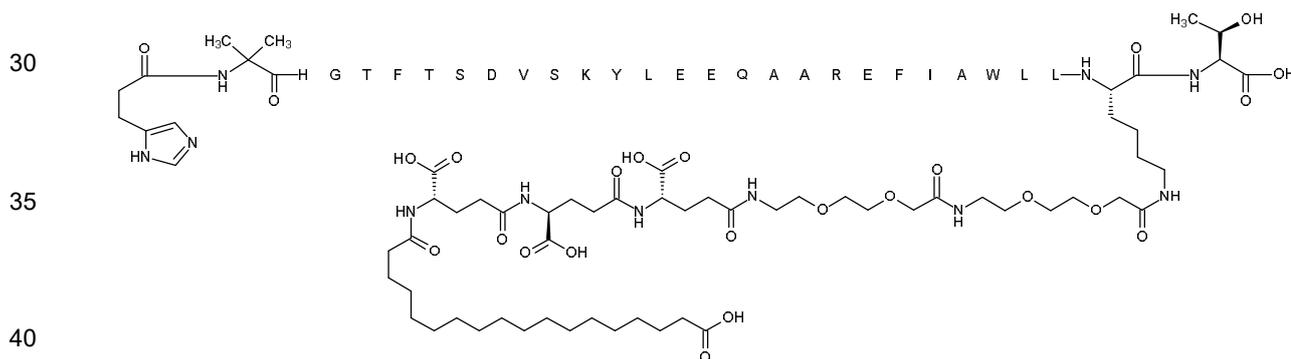
(Sustancia química 28)

UPLC02: Rt = 8,3 min

20 LCMS01: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4840; Encontrado m/4 = 1211; Encontrado m/5 = 969

Ejemplo 29

25 $N^{\epsilon 34}$ -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



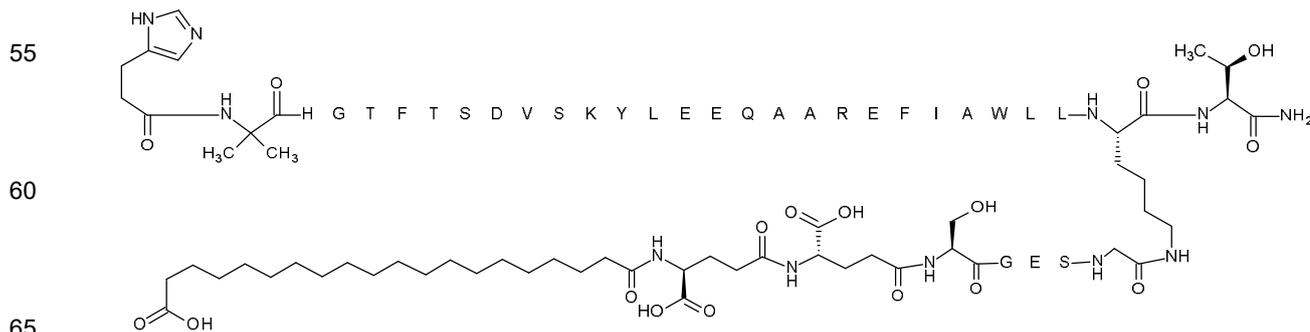
(Sustancia química 29)

UPLC02: Rt = 9,05 min

45 LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4323; Encontrado m/3 = 1442; Encontrado m/4 = 1082; Encontrado m/5 = 866

Ejemplo 30

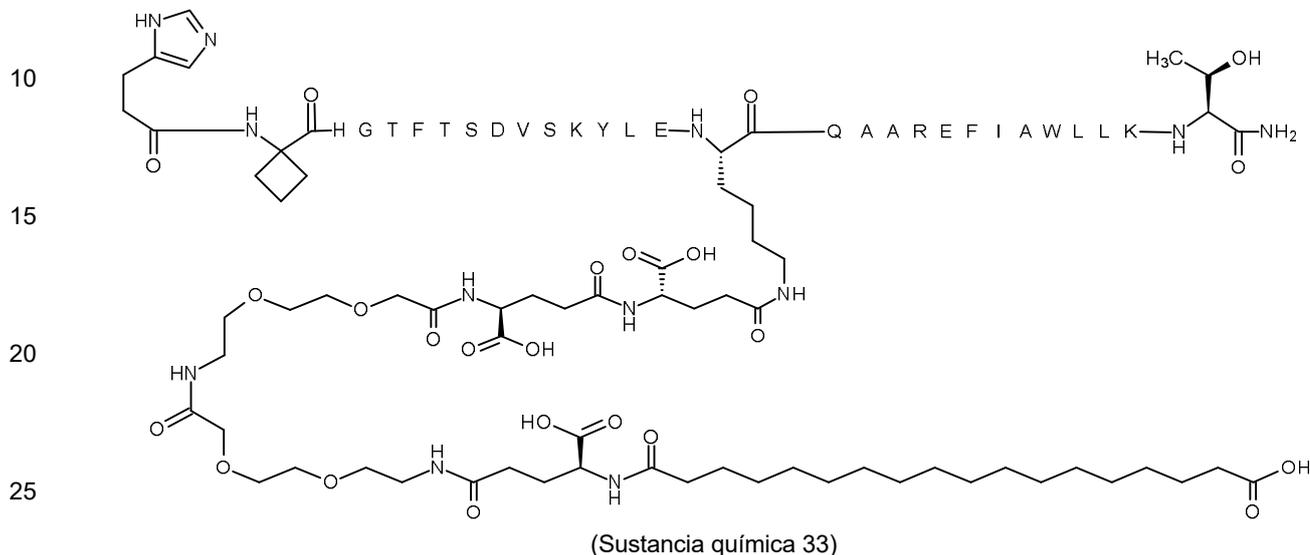
50 amida de $N^{\epsilon 34}$ -[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



(Sustancia química 30)

Ejemplo 33

amida de N^{ε22}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoilo]-[Imp7,Ac8,His9,Lys18,Lys22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

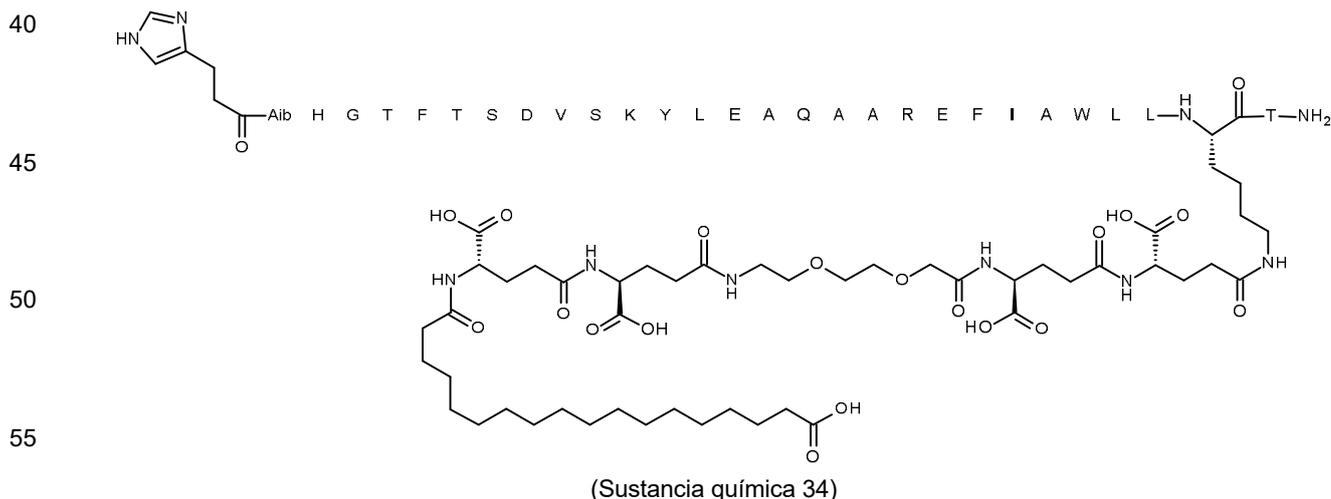


UPLC02: Rt = 8,3 min

LCMS13: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4333; Encontrado m/3 = 1445; Encontrado m/4 = 1084; Encontrado m/5 = 867

Ejemplo 34

amida de N^{ε34}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoilo]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Ala22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

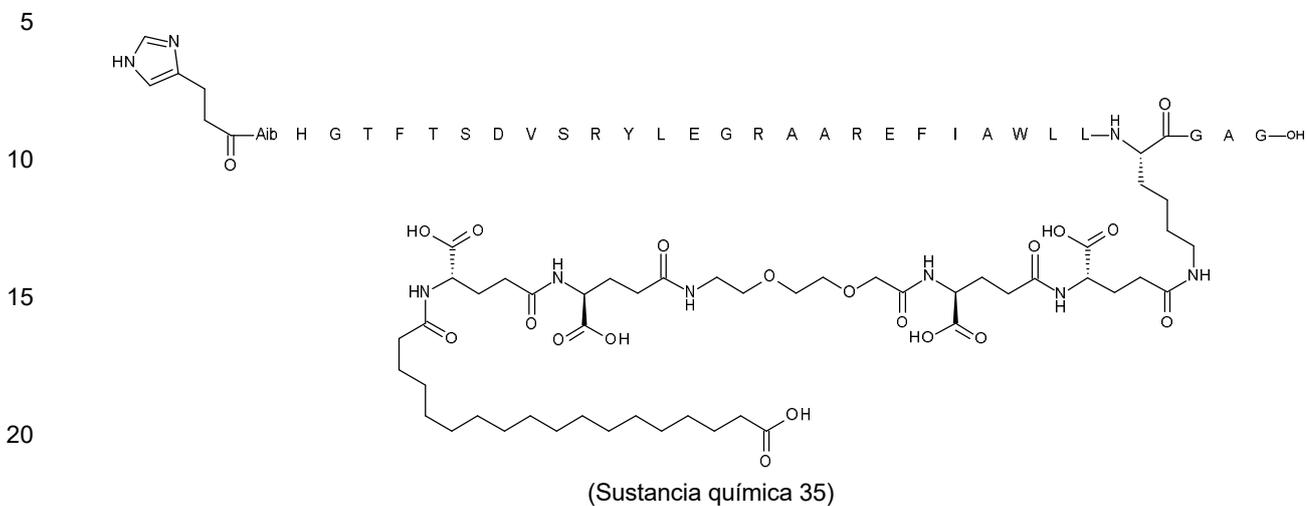


UPLC02: Rt = 8,9 min

LCMS13: Rt = 2,4 min; Calc m/1 = 4248; Encontrado m/3 = 1417

Ejemplo 35

N^{ε34}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ala36]-GLP-1-(7-37)-peptido

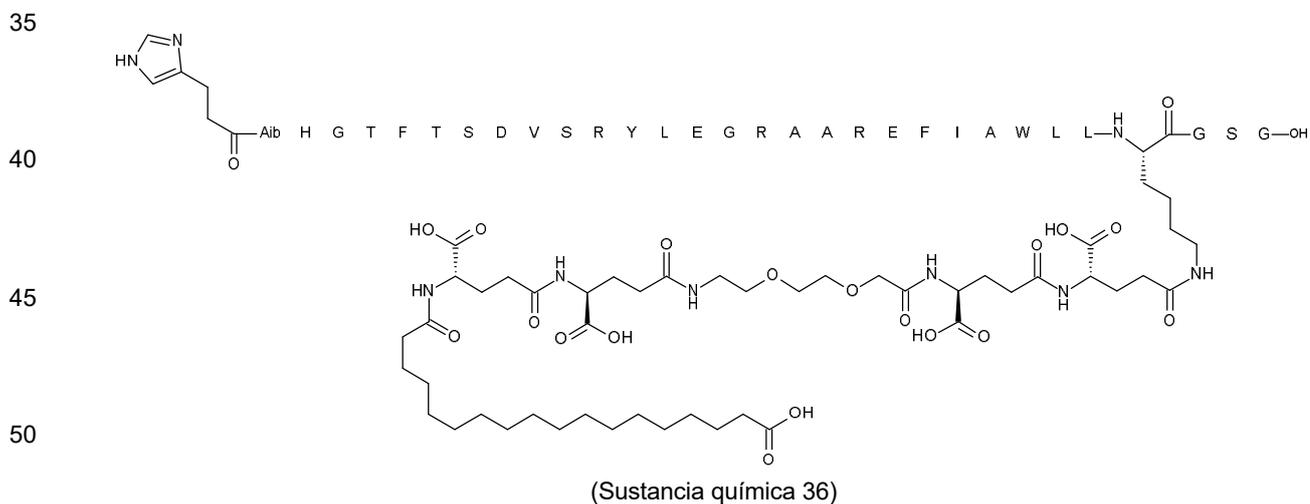


25 UPLC02: Rt = 9,8 min

LCMS13: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4375; Encontrado m/3 = 1459; Encontrado m/4 = 1095

Ejemplo 36

N^{ε34}-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]butanoil]-[Imp7,Aib8,His9,Arg18,Arg23,Arg26,Leu33,Ser36]-GLP-1-(7-37)-peptido

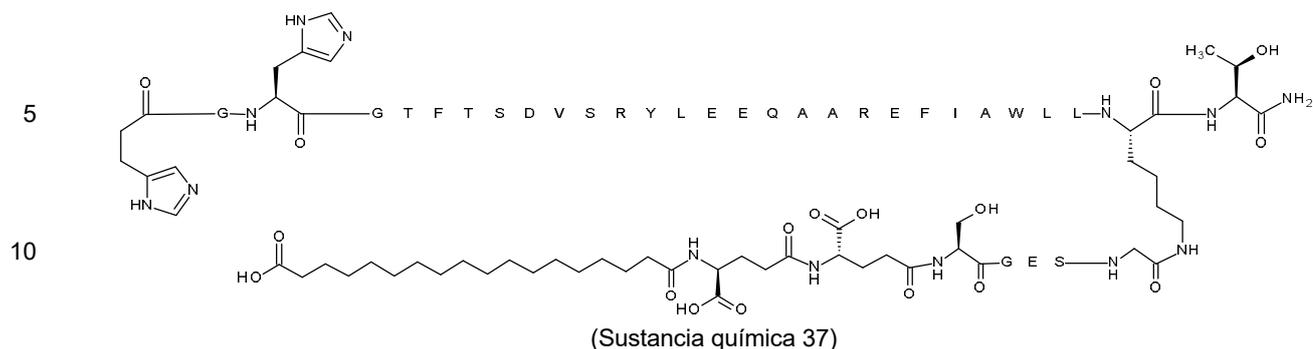


55 UPLC02: Rt = 9,7 min

LCMS13: Rt = 2,3 min; Calc m/1 = 4391; Encontrado m/3 = 1465; Encontrado m/4 = 1099

Ejemplo 37

amida de N^{ε34}-[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-carboxi-2-[2-[[[(2S)-2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]-3-hidroxiopropanoil]amino]acetil]-[Imp7,Gly8,His9,Arg18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-peptido

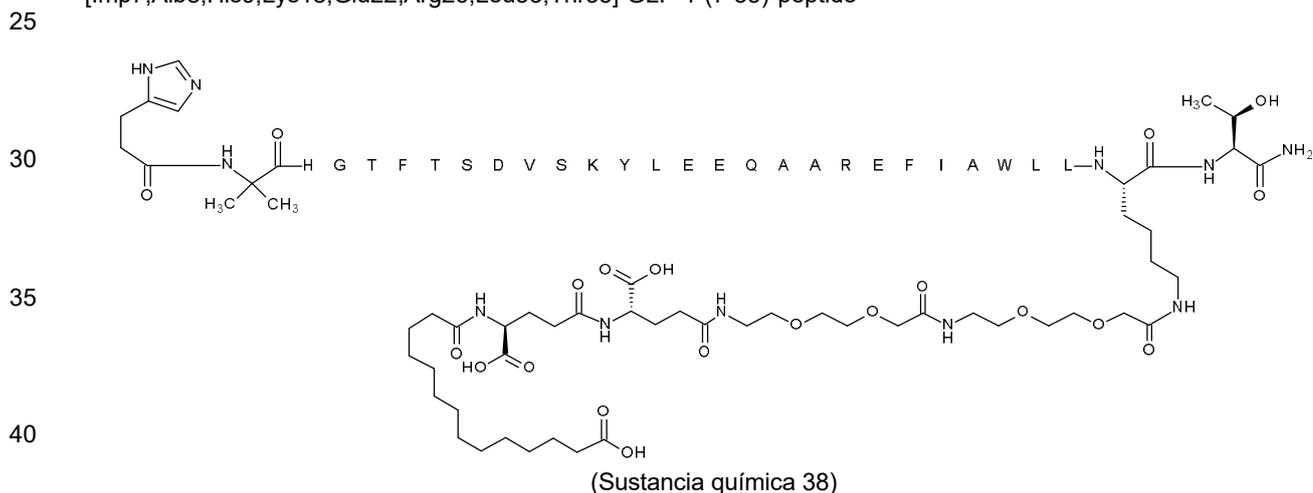


15 UPLC02: Rt = 9,0 min

LCMS01: Rt = 2,2 min; Calc m/1 = 4320; Encontrado m/3 = 1441; Encontrado m/4 = 1081; Encontrado m/5 = 865

20 **Ejemplo 38**

amida de N^ε34-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



45 UPLC02: Rt = 8,7 min

LCMS01: Rt = 2,1 min; Calc m/1 = 4137; Encontrado m/3 = 1380; Encontrado m/4 = 1035; Encontrado m/5 = 828

50 **Ejemplo 39**

amida de N^ε34-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido

(a) Activación del receptor de GLP-1*Cultivo celular y preparación*

5 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.

10 Las células se cultivaron en CO₂ al 5 % en medio DMEM con FBS al 10 %, GlutaMAX 1x, G418 1 mg/ml, MTX (metotrexato) 240 nM y pen/estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 %. Se dividieron en alícuotas y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes de cada ensayo, se tomó una alícuota y se lavó tres veces en PBS antes de suspenderse a la concentración deseada en medio de ensayo. Se preparó la suspensión para placas de 96 pocillos para obtener una concentración final de 5x10⁵ células/pocillo.

15 *Materiales*

Se usaron los siguientes compuestos químicos en el ensayo: Pluronic F-68 (10 %) (Gibco 2404), 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). El medio de ensayo consistió en DMEM sin rojo de fenol, Hepes 10 nM, Glutamax 1x, Ovoalbúmina al 2 % y Pluronic F-68 al 0,2 %.

Procedimiento

25 Las reservas de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Las células se lavaron tres veces en PBS. Las células se contaron y se ajustaron a 5x10⁵ células/50 µl (1x10⁶ células/ml) en medio de ensayo. Se transfirió una alícuota de 50 µl de células a cada pocillo en la placa de ensayo.

30 Las soluciones madre de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia se diluyeron a una concentración de 0,2 µM en medio de ensayo. Los compuestos se diluyeron 10 veces para obtener las siguientes concentraciones: 2x10⁻⁶ M, 2x10⁻⁷ M, 2x10⁻⁸ M; 2x10⁻⁹ M, 2x10⁻¹⁰ M, 2x10⁻¹¹ M, 2x10⁻¹² M y 2x10⁻¹³ M. Para cada compuesto se incluyó, además, un control de medio de ensayo en blanco.

35 Se transfirió una alícuota de 50 µl del compuesto o del blanco de la placa de dilución a la placa de ensayo. Los compuestos se probaron a las siguientes concentraciones finales: 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁷ M, 1x10⁻⁸ M; 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹⁰ M, 1x10⁻¹¹ M y 1x10⁻¹² M y 1x10⁻¹³ M.

40 La placa de ensayo se incubó durante 3 h en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. La placa del ensayo se retiró de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió una alícuota de 100 µl de reactivo steadylite plus a cada pocillo de la placa de ensayo (el reactivo es sensible a la luz). Cada placa de ensayo se cubrió con papel de aluminio para protegerla de la luz y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Cada placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Perkin Elmer.

Cálculos

45 Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático realizó una regresión no lineal (log(agonista) frente a respuesta- pendiente de la variable (cuatro parámetros)). Los valores de EC₅₀ se calcularon por el programa informático y se informaron en pM.

(b) Activación del receptor de glucagón

50

Cultivo celular y preparación

Las células usadas en este ensayo (clon pLJ6'-4-25) fueron células BHK con BHK570 como una línea celular parental que expresan el gen de luciferasa CRE (clon BHK/KZ10-20-48) y se establecieron mediante transfección posterior con el receptor de glucagón humano (clon pLJ6' en vector pHZ-1).

60 Las células se cultivaron en CO₂ al 5 % en medio DMEM con FBS al 10 %, GlutaMAX 1x, G418 1 mg/ml, MTX (metotrexato) 240 nM y pen/estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 %. Se dividieron en alícuotas y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes de cada ensayo, se tomó una alícuota y se lavó tres veces en PBS antes de suspenderse a la concentración deseada en medio de ensayo. Se preparó la suspensión para placas de 96 pocillos para obtener una concentración final de 5x10⁵ células/pocillo.

Materiales

65 Se usaron los siguientes compuestos químicos en el ensayo: Pluronic F-68 (10 %) (Gibco 2404), 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). El medio de ensayo consistió en DMEM sin rojo de fenol, Hepes 10 nM, Glutamax 1x, Ovoalbúmina al 2 % y Pluronic F-68 al 0,2 %.

Procedimiento

5 Las reservas de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Las células se lavaron tres veces en PBS. Las células se contaron y se ajustaron a 5x10⁵ células/50 µl (1x10⁵ células/ml) en medio de ensayo. Se transfirió una alícuota de 50 µl de células a cada pocillo en la placa de ensayo.

10 Las soluciones madre de los compuestos de prueba y los compuestos de referencia se diluyeron a una concentración de 0,2 µM en medio de ensayo. Los compuestos se diluyeron 10 veces para obtener las siguientes concentraciones: 2x10⁻⁶ M, 2x10⁻⁷ M, 2x10⁻⁸ M; 2x10⁻⁹ M, 2x10⁻¹⁰ M, 2x10⁻¹¹ M, 2x10⁻¹² M y 2x10⁻¹³ M. Para cada compuesto se incluyó, además, un control de medio de ensayo en blanco.

15 Se transfirió una alícuota de 50 µl del compuesto o del blanco de la placa de dilución a la placa de ensayo. Los compuestos se probaron a las siguientes concentraciones finales: 1x10⁻⁶ M, 1x10⁻⁷ M, 1x10⁻⁸ M; 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹⁰ M, 1x10⁻¹¹ M y 1x10⁻¹² M y 1x10⁻¹³ M.

20 La placa de ensayo se incubó durante 3 h en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. La placa del ensayo se retiró de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió una alícuota de 100 µl de reactivo steadylite plus a cada pocillo de la placa de ensayo (el reactivo es sensible a la luz). Cada placa de ensayo se cubrió con papel de aluminio para protegerla de la luz y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Cada placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Perkin Elmer.

Cálculos

25 Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático realizó una regresión no lineal (log(agonista) frente a respuesta- pendiente de la variable (cuatro parámetros)). Los valores de EC₅₀ se calcularon por el programa informático y se informaron en pM.

Ensayo (II): Unión a los receptores de GLP-1 y de glucagón

30 El propósito de este ensayo es analizar la actividad de unión al receptor in vitro de los derivados de GLP-1 de la invención.

(a) Unión al receptor de GLP-1

35 La unión al receptor de GLP-1 (GLP-1R) es una medida de la afinidad de un derivado por el receptor de GLP-1 humano.

Principio

40 La unión al receptor de GLP-1 de cada derivado se determinó con unión competitiva, desplazando [¹²⁵I]-GLP-1 unido a receptores GLP-1 expresados en membranas celulares asociadas con perlas de ensayo de proximidad de centelleo de aglutinina de germen de trigo (WGA). Cada derivado se añadió en una serie de concentraciones a membranas aisladas que comprendían el receptor de GLP-1 humano y se monitoreó el desplazamiento del radioligando marcado. La unión al receptor se informó como la concentración a la que la mitad del ligando marcado se desplaza del receptor, el valor de IC₅₀.

Materiales

45 Se usaron los siguientes compuestos químicos en el ensayo: DMEM sin rojo de fenol (Gibco 11880-028), Pen/Estrep (Invitrogen 15140-122), G418 (Invitrogen 10131-027), Hepes 1 M (Gibco 15630), EDTA (Invitrogen 15575-038), PBS (Invitrogen 14190-094), suero fetal bovino (Invitrogen 16140-071), EGTA, MgCl₂ (Merck 1.05832.1000), Tween 20 (Amresco 0850C335), partículas de SPA (perlas de SPA con aglutinina de germen de trigo (WGA), Perkin Elmer RPNQ0001), [¹²⁵I]-GLP-1-(7-36)NH₂ (producido internamente), OptiPlatEtM-96 (Perkin Elmer).

50 El tampón 1 consistió en Na-HEPES 20 mM más EDTA 10 mM y el pH se ajustó a 7,4. El tampón 2 consistió en Na-HEPES 20 mM más EDTA 0,1 mM y el pH se ajustó a 7,4. El tampón del ensayo consistió en HEPES 50 mM suplementado con EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,005 % y el pH se ajustó a 7,4. Una solución madre de albúmina al 0,02 % consistió en HSA disuelta al 0,02 % (p/v) en tampón de ensayo.

Cultivo celular y preparación de membranas

65 Las células usadas en este ensayo (clon FCW467-12A) fueron células BHK con BHKTS13 como una línea celular parental. Las células expresan el receptor de GLP-1 humano.

Las células se cultivaron en CO₂ al 5 % en DMEM, suero fetal bovino al 10 %, Pen/Estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418. Para elaborar una preparación de membrana, las células se cultivaron a aproximadamente 80 % de confluencia. Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato y se cosecharon. Las células se sedimentaron mediante el uso de una centrifugación breve y el sedimento celular se mantuvo en hielo. El sedimento celular se homogenizó con un instrumento de dispersión ULTRA-THURRAX durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada de tampón 1 (por ejemplo, 10 ml). El homogenizado se centrifugó durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió (homogeneizó) en 10 ml de tampón 2 y se centrifugó. Esta etapa se repitió una vez más. El sedimento resultante se resuspendió en el tampón 2 y se determinó la concentración de proteínas. Las membranas se dividieron en alícuotas y se almacenaron a menos 80°C.

Procedimiento

1. Para el ensayo de unión al receptor, se añadieron 50 µl del tampón de ensayo a cada pocillo de una placa de ensayo.
2. Los compuestos de prueba se diluyeron en serie para proporcionar las siguientes concentraciones: 8x10^{EE-7} M, 8x10^{EE-8} M, 8x10^{EE-9} M, 8x10^{EE-10} M, 8x10^{EE-11} M, 8x10^{EE-12} M y 8x10^{EE-13} M. Se añadieron veinticinco µl a los pocillos apropiados en la placa de ensayo.
3. Las alícuotas de membrana celular se descongelaron y diluyeron hasta su concentración de trabajo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.
4. Las perlas de SPA con WGA se suspendieron en tampón de ensayo a 20 mg/ml. La suspensión se diluyó a 10 mg/ml en tampón de ensayo justo antes de la adición a la placa de ensayo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.
5. La incubación se inició mediante la adición de 25 µl de solución de [125I]-GLP-1]-(7-36)NH₂ 480 pM a cada pocillo de la placa de ensayo. Se reservó una alícuota de 25 µl para medir los conteos totales/pocillo.
6. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 30 °C.
7. La placa de ensayo se centrifugó durante 10 min.
8. La placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Perkin Elmer.

Cálculos

Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático promedió los valores para las réplicas y realizó una regresión no lineal. Los valores de IC₅₀ se calcularon por el programa informático y se informaron en nM.

(b) Unión al receptor de glucagón

La actividad de unión al receptor de glucagón (glucagónR) es una medida de la afinidad de un derivado para el receptor de glucagón humano.

Principio

La unión al receptor de glucagón de cada derivado se determinó con unión competitiva, desplazando [125I]-glucagón unido a receptores de glucagón expresados en membranas celulares asociadas con perlas de ensayo de proximidad por centelleo de aglutinina de germen de trigo (WGA). Cada derivado se añadió en una serie de concentraciones a membranas aisladas que comprendían el receptor de glucagón humano y se monitoreó el desplazamiento del ligando marcado. La unión al receptor se informó como la concentración a la que la mitad del ligando marcado se desplaza del receptor, el valor de IC₅₀.

Materiales

Se usaron los siguientes compuestos químicos en el ensayo: DMEM w Glutamax (Gibco 61965-026), Pen/Estrep (Invitrogen 15140-122), G418 (Invitrogen 10131-027), Versene (Gibco 15040), Hepes 1 M (Gibco 15630), PBS (Invitrogen 14190-094), suero fetal bovino (Invitrogen 16140-071), MgCl₂ (Merck 1.05832.1000), EDTA (Invitrogen 15575-038), CaCl₂ (Sigma, C5080), Tween 20 (Amresco 0850C335), ovoalbúmina (Sigma A5503), partículas de SPA (perlas de SPA con aglutinina de germen de trigo (WGA), Perkin Elmer RPNQ0001), [125I]-glucagón (producido internamente), OptiPlatEtM-96 (Packard 6005290).

El tampón HME consistió en HEPES 25 mM, MgCl₂ 2 mM y EDTA 1 mM, y el pH se ajustó a 7,4. El tampón del ensayo consistió en HEPES 50 mM suplementado con MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 al 0,02 % y Ovoalbúmina al 0,1 %, y el pH se ajustó a 7,4.

5 *Cultivo celular y preparación de membranas*

Las células usadas en este ensayo (clon BHK hGCGR A3*25) fueron células BHK transfectadas establemente con un plásmido de expresión que comprendía el ADNc que codifica el receptor de glucagón humano.

10 Las células se cultivaron en CO₂ al 5 % en DMEM, suero fetal bovino al 10 %, Pen/Estrep (penicilina/estreptomicina) al 1 % y 1,0 mg/ml del marcador de selección G418. Para elaborar una preparación de membrana, las células se cultivaron a aproximadamente 80 % de confluencia. Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato y se cosecharon. Las células se sedimentaron mediante el uso de una centrifugación breve y el sedimento celular se mantuvo en hielo. Las células se lisaron al añadir aprox. 5 ml de tampón HME, se mezclaron por pipeteo y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se descongeló rápidamente y se añadió tampón HME a 10 ml. El sedimento celular se homogeneizó con un instrumento de dispersión ULTRA-THURRAX durante 20-30 segundos. El homogenado se centrifugó a 20 000 G, 4 °C durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió (homogenizó) en 1-2 ml de tampón HME. Se determinó la concentración de proteína. Las membranas se separaron en alícuotas y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a menos 80°C.

20 *Procedimiento*

1. Para el ensayo de unión al receptor, se añadieron 50 µl del tampón de ensayo a cada pocillo de una placa de ensayo.
- 25 2. Los compuestos de prueba se diluyeron en serie para proporcionar las siguientes concentraciones: 8x10^{EE-7} M, 8x10^{EE-8} M, 8x10^{EE-9} M, 8x10^{EE-10} M, 8x10^{EE-11} M, 8x10^{EE-12} M y 8x10^{EE-13} M. Se añadieron veinticinco µl a los pocillos apropiados en la placa de ensayo.
- 30 3. Las alícuotas de membrana celular se descongelaron y diluyeron hasta su concentración de trabajo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.
4. Las perlas de SPA con WGA se suspendieron en tampón de ensayo a 20 mg/ml. La suspensión se diluyó a 10 mg/ml en tampón de ensayo justo antes de la adición a la placa de ensayo. Se añadieron cincuenta µl a cada pocillo en la placa de ensayo.
- 35 5. La incubación se inició mediante la adición de 25 µl de solución de [125I]-glucagón 480 pM a cada pocillo de la placa de ensayo. Se reservó una alícuota de 25 µl para medir los conteos totales/pocillo.
- 40 6. La placa de ensayo se incubó durante 2 h a 25 °C.
7. La placa de ensayo se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm.
8. La placa de ensayo se leyó en un instrumento TopCount NXT de Perkin Elmer.

45 *Cálculos*

Los datos del instrumento TopCount se transfirieron al programa informático GraphPad Prism. El programa informático promedió los valores para las réplicas y realizó una regresión no lineal. Los valores de IC⁵⁰ se calcularon por el programa informático y se informaron en nM.

Ensayo (III): Ensayos de fibrilación con ThT para la evaluación de la estabilidad física de las composiciones de péptidos

55 El propósito de este ensayo es evaluar la estabilidad física de los derivados de GLP-1 de la invención en soluciones acuosas.

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

65

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

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

Aquí, como se representa en la Figura1, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante t₀ es el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrillas son el tiempo de retraso calculado mediante t₀ - 2τ y la constante de la tasa aparente kapp 1/τ.

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

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

Se colocaron alícuotas de muestra de 200 μl (250 μM del derivado de GLP-1 en tampón HEPES 10 mM, pH 7,5) en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Usualmente, se colocaron cuatro u ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

La incubación a una temperatura dada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizó en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La placa se incubó con agitación orbital ajustada a 960 rpm con una amplitud de 1 mm. La medición de la fluorescencia se realizó mediante el uso de excitación a través de un filtro de 444 nm y la medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm.

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

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

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

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

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

Ensayo (IV): Perfil farmacocinético en ratones

El propósito de este ensayo es evaluar los perfiles farmacocinéticos de los derivados de GLP-1 de la invención en ratones.

El perfil farmacocinético de los derivados de GLP-1 puede analizarse en ratones c57/Bl6 machos normales (peso corporal aproximado: 30 gramos), n = 12 con, por ejemplo, 3 ratones representados en cada punto temporal (por ejemplo: t= 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 10, 24, 30 y 48 horas). El compuesto puede dosificarse como una dosis subcutánea única de 10 nmol/kg.

Los niveles plasmáticos de los derivados de GLP-1 pueden determinarse mediante el uso de un ensayo ELISA/LOCI o LCMS. Los cálculos farmacocinéticos tales como vida media ($T_{1/2}$) concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y tiempo para la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$) de los compuestos pueden determinarse mediante el uso del programa informático basado en PC, Phoenix (WinNonLin versión 6.3 de Pharsight, Certara).

5

Ensayo (V): Evaluación de la estabilidad química

El propósito de este ensayo es evaluar la estabilidad química de los derivados de GLP-1 de la presente invención en soluciones acuosas.

10

La estabilidad química de los derivados de GLP-1 puede investigarse mediante la separación por RP-UPLC y la detección UV. Las muestras liofilizadas se disuelven en un tampón fosfato 8 mM pH 8,6, seguido del ajuste a pH 7,3 mediante el uso de HCl hasta una concentración final de 333 μ M. Las muestras se incuban durante 14 días a 5 °C y 37 °C seguido del análisis por RP-UPLC. La pureza se define como el porcentaje de área del pico principal en relación con el área total de todos los picos integrados en cada cromatograma. La pérdida de pureza, también denominada en la presente descripción degradación química, después de 14 días a 37 °C se determina como la diferencia en pureza entre las muestras incubadas a 5 °C y 37 °C, dividido por la pureza de la muestra después de la incubación durante 14 días a 5 °C.

15

20

El análisis por RP-UPLC se realiza mediante el uso de una columna Waters BEH130 2,1 mm x 150 mm, 1,7 μ m operada a 50 °C y una tasa de flujo de 0,4 ml/min mediante el uso de un sistema de fase móvil que consiste en A: TFA al 0,05 % en agua-MQ, y B: TFA al 0,05 % en acetonitrilo. La detección UV se realiza a 215 nm. El perfil de gradiente típico usado para la mayoría de las muestras se muestra más abajo.

25

Perfil de gradiente típico usado para el análisis por RP-UPLC:

Tiempo (min)	%B
Inyección	20
30	60
31	99
37	99
39	20
40	20
45	20

30

35

40

Para algunos derivados individuales que eluyen en tiempos de retención sustancialmente diferentes en comparación con la mayoría de los derivados, se realizan algunos ajustes al perfil de gradiente para permitir una mejor comparación de la evaluación de pureza entre las muestras.

45

El Ejemplo 44 y la Tabla 2 presentan información producida mediante el uso del Ensayo (V).

Ejemplo 43: Potencia del receptor, unión al receptor y estabilidad física de los derivados de GLP-1

La potencia del receptor de GLP-1 y glucagón (EC_{50}) y la afinidad (IC_{50}), así como también la estabilidad física, se determinaron para los derivados de GLP-1 seleccionados de acuerdo con los métodos descritos en los Ensayos (I), (II) y (III) en la presente descripción. El ensayo (III) se llevó a cabo a pH 7,5. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

50

ES 2 805 326 T3

Tabla 1. Valores de EC50 e IC50 en los receptores de GLP-1 y glucagón humanos y la estabilidad física de los derivados de GLP-1 evaluados en el ensayo de ThT.

Compuesto de Ejemplo núm.	EC50 GLP-1R [pM]	IC50 GLP-1R [nM]	EC50 Glucagón R [pM]	IC50 Glucagón R [nM]	ensayo con ThT pH 7,5: Tiempo de retraso [h]	ensayo con ThT pH 7,5: Recuperación [%]
Ejemplo 1	5,7	0,7	117,0	16,0	45,0	100,0
Ejemplo 2	2,0	0,1	163,0	43,9	45,0	100,0
Ejemplo 3	5,0	0,4	40,7	3,2	45,0	94,0
Ejemplo 4	7,0	0,2	45,0	4,3	45,0	100,0
Ejemplo 5	5,2	0,5	120,3	4,3	45,0	101,7
Ejemplo 6	7,0	0,3	44,0	4,2	45,0	100,0
Ejemplo 7	6,0	0,5	60,0	3,8	45,0	106,0
Ejemplo 8	17,0	0,9	143,0	8,9	45,0	100,0
Ejemplo 9	5,0	0,1	40,0	4,1	45,0	100,0
Ejemplo 10	8,0	1,0	229,0	25,9	45,0	100,0
Ejemplo 11		0,9		69,5	45,0	106,0
Ejemplo 12	6,0	0,7	83,0	20,3	45,0	100,0
Ejemplo 13		0,5		56,0	45,0	100,0
Ejemplo 14		3,2		31,1	2,7	43,0
Ejemplo 15		1,9		80,2	45,0	50,0
Ejemplo 16		13,1		51,0	45,0	50,0
Ejemplo 17		19,0		43,4	0,0	89,0
Ejemplo 18	8,0	2,2	1290,0	126,0	45,0	56,0
Ejemplo 19	7,0	2,9	143,0	21,2	45,0	75,0
Ejemplo 20	12,0	0,3	28,0	7,2	45,0	100,0
Ejemplo 21	3,0	1,4	78,0	6,9	45,0	100,0
Ejemplo 22	3,0	0,9	71,0	5,6	11,7	94,0
Ejemplo 23	7,0	2,3	84,0	11,7	13,3	53,0
Ejemplo 24	8,0	1,8	54,0	8,6	45,0	100,0
Ejemplo 25		6,9		18,8	45,0	100,0
Ejemplo 26	16,0	7,3	222,5	22,5	45,0	102,0
Ejemplo 27	5,5	2,3	84,5	11,9	45,0	100,0
Ejemplo 28	18,5	6,8	225,5	36,7	45,0	86,5
Ejemplo 29		4,6		28,1	45,0	100,0
Ejemplo 30	5,0	0,4	111,0	6,0	45,0	94,0
Ejemplo 31	2,2	0,3	39,4	3,7	45,0	101,7
Ejemplo 32		0,2		14,1		
Ejemplo 33		0,2		17,9		

5	Ejemplo 34	3,0	0,6	21,0	1,7	45,0	100,0
	Ejemplo 35	3,0	1,0	248,0	18,8	45,0	95,0
	Ejemplo 36	6,0	1,7	158,0	11,4	45,0	100,0
	Ejemplo 37	8,0	3,2	459,1	9,6	45,0	100,0
10	Ejemplo 38	12,0	1,5	52,6	3,7		
	Ejemplo 39	60,7	1,3	46,1	4,0		
	Ejemplo 40	62,9	0,4	917,4	10,1		
15	Ejemplo 41	14,7	1,1	54,2	5,1		
	Ejemplo 42	18,3	0,2	105,6	11,8		

Los resultados en la Tabla 1 muestran los derivados de GLP-1 que son coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón. Además, los resultados muestran que la mayoría de los derivados de GLP-1 exhiben una alta estabilidad física inesperada evaluada por el tiempo de retraso y/o recuperación en el ensayo de fibrilación con ThT.

Ejemplo 44: Estabilidad química de los derivados de GLP-1

La estabilidad química de los derivados de GLP-1 seleccionados se determinó de acuerdo con el método descrito en el Ensayo (V) en la presente descripción. El ensayo (V) se realizó a pH 7,3.. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

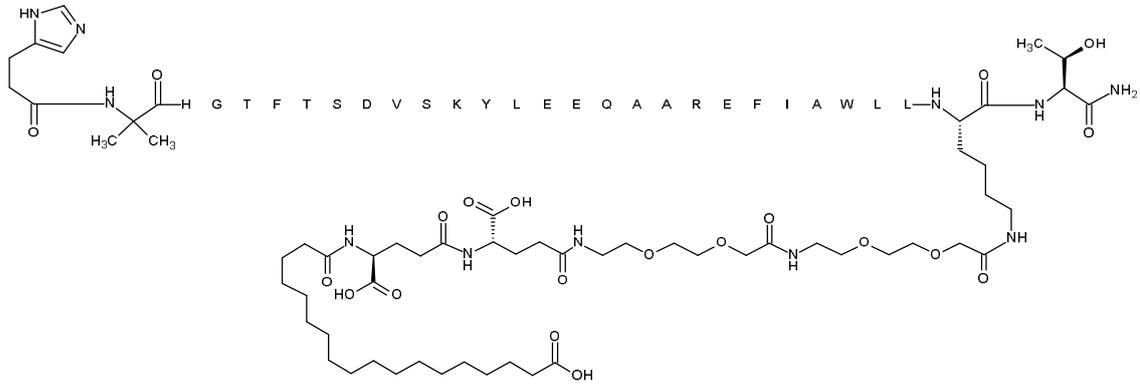
Tabla 2. Estabilidad química de los coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón. Los datos muestran la degradación química en % después de la incubación durante 14 días a 37 °C en tampón fosfato (pH 7,3).

Compuesto de Ejemplo núm.	Estabilidad química: Degradación química durante 14 días a 37 °C [%]	
35	Ejemplo 1	1,5
	Ejemplo 3	-0,3
40	Ejemplo 4	0,2
	Ejemplo 5	0,4
	Ejemplo 6	0,1
45	Ejemplo 7	0,0
	Ejemplo 8	1,6
	Ejemplo 9	0,2
50	Ejemplo 10	2,0
	Ejemplo 12	4,4
	Ejemplo 20	0,4
55	Ejemplo 21	1,6
	Ejemplo 24	2,2
	Ejemplo 31	0,1

Los resultados en la Tabla 2 demuestran que los coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón inesperadamente tienen una estabilidad química de buena a excelente.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de GLP-1 caracterizado por tener la fórmula: amida de N^{ε34}-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Imp7,Aib8,His9,Lys18,Glu22,Arg26,Leu33,Thr35]-GLP-1-(7-35)-péptido



(Sustancia química 5);

2. Una composición farmacéutica que comprende el derivado de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
3. El derivado de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de la obesidad, la hiperglucemia, la diabetes tipo 2, la tolerancia a la glucosa alterada, y/o la diabetes tipo 1.

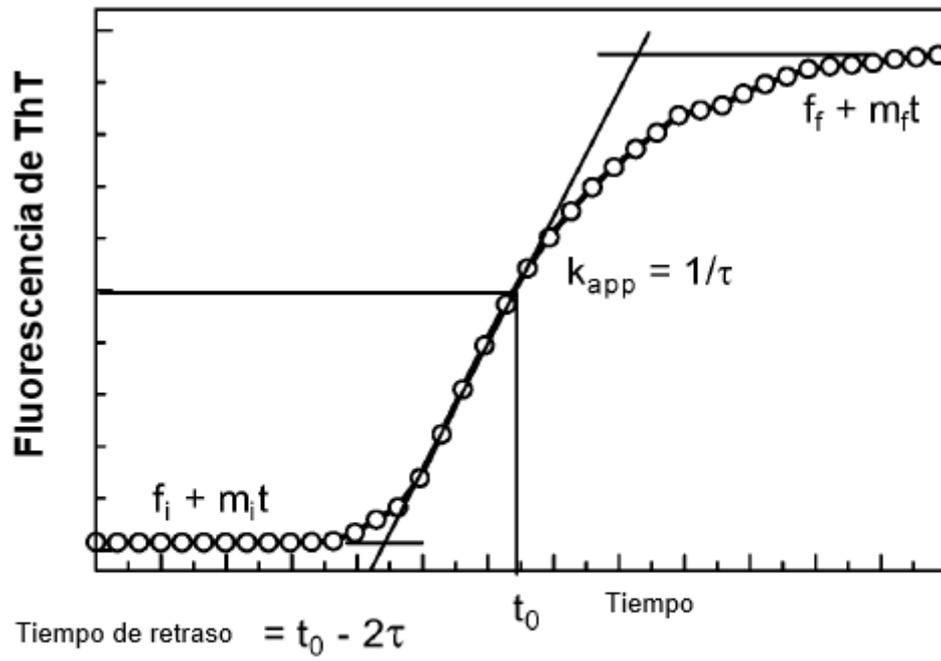


Figura 1